



Universidade de Aveiro Departamento de Química

2010/2011

**Sara Barone
De Oliveira**

**Desenvolvimento de métodos bioanalíticos para
acetamida**



**Sara Barone
De Oliveira**

**Desenvolvimento de métodos bioanalíticos para
acetamida**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutor Artur Manuel Soares Da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Amin Mahamede Vissanji Karmali

Professor Coordenador com Agregação da área departamental de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa

agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes a perseverança que teve comigo ao longo do ano, sempre disponível para a me dar as melhores condições de trabalho.

Ao professor Amin Mahamede Vissanji Karmali, do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, agradeço a cedência de alguns reagentes e material biológico, componente essencial para o desenvolvimento da minha tese.

Agradeço ao grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, mais propriamente a Professora Maria Da Graça De Pinho Morgado Silva Neves e a Doutoranda Sónia Pires pela cedência de reagentes, transmissão de conhecimento e ajuda na parte laboratorial.

Aos professores Dmitry Victoravitch Evtugin e Rui Vitorino agradeço a disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas e cedência de alguns reagentes

Agradeço a todos os membros do laboratório que frequentei, pela disponibilidade e ajuda que me deram, pelo convívio e boa disposição ao longo do ano.

Agradeço a disponibilidade do Senhor Moraes e do Senhor Cândido pelo apoio técnico ao longo do ano na resolução de problemas com material de vidro e problemas eléctricos.

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram ao longo do ano, tornado esta tese possível.

palavras-chave

Acetamida, acrilamida, amidase, FIA, sensor acústico, mobilização

resumo

O presente trabalho teve como objectivo desenvolver um método bioanalítico baseado em sensores acústicos, para detectar e quantificar amidas tóxicas, entre as quais acetamida e acrilamida. Utilizou-se a enzima amidase (EC 3.5.1.4) de *Pseudomonas aeruginosa* L10, para converter a acetamida em compostos de menor toxicidade como o ião amónio e ácido acético. O ião amónio foi detectado por um sensor acústico com um revestimento químico apropriado. Testaram-se dois sistemas associando as duas componentes (química e biológica). No primeiro depositaram-se as duas componentes sobre um cristal. No segundo, inseriu-se num sistema de injeção em iluxo (FIA) o cristal revestido com o componente químico e a biológico foi imobilizado num biorreactor.

Na concepção do biorreactor, testaram-se vários métodos de imobilização para o biocatalisador. Este foi confinado em contas de alginato de cálcio e imobilizado em esferas e capilares de vidro silanizados.

A silanização foi feita pelo método de sol-gel e com solventes orgânicos com 3-aminopropiltrietoxissilano (APTS). A imobilização do biocatalisador foi feita com glutaraldeído (GA). Em todos estes casos, obtiveram-se respostas da conversão da acetamida pela amidase, tendo-se conseguido melhores resultados com a funcionalização das paredes do capilar com extracto celular.

keywords

Acetamide, acrylamide, Amidase, FIA, acoustic sensor, immobilization

abstract

The aim of this work was to develop a bioanalytical method based on an acoustic sensor to detect and quantify toxic amides namely acetamide and acrylamide. The enzyme amidase (EC 3.5.1.4) from *Pseudomonas aeruginosa* L10 was used to convert acetamide in less toxic compounds such as ammonium ion and acetic acid. The ammonium ion was detected by an acoustic sensor with an appropriate chemical coating. Two systems combining a chemical sensitive coating and a biocatalyst were tested. One of them was a two layer acoustic sensor, while the other includes a bioreactor separated from the chemical sensor. The last one, is part of a flow injection analytical system (FIA). For the design of the bioreactor, several immobilization methods were tested. Biocatalyst was present in whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* L10 or cellular extract. The biocatalyst was either confined in calcium alginate beads or immobilized in silanized glass capillaries and glass beads. The silanization was based on the sol-gel techniques and reaction with organic solvents using 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS). The biocatalyst was immobilized with glutaraldehyde (GA). In all the experiments responses from conversion of acetamide mediated by the amidase were obtained. The best results were achieved with the functionalization of the capillary walls with cellular extract.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas	v
Siglas.....	vi
1. Introdução	1
2. Fundamentos teóricos.....	3
2.1 Amidas e a sua Importância	5
2.1.1 Acetamida	5
2.1.1.1 Fontes.....	6
2.1.1.2 Toxicologia	6
2.1.1.3 Legislação	7
2.1.2 Acrilamida	8
2.1.2.1 Fontes.....	8
2.1.2.2 Toxicologia	11
2.1.2.3 Legislação	13
Limites legais	14
2.2 Métodos de análise de amidas.....	15
2.2.1 Análise de Acetamida	15
2.2.2 Análise de Acrilamida	17
2.3 Sensor Acústico	21
2.3.1 Piezoelectricidade	22
2.3.2 Microbalanças de Cristais de Quartzo (MCQ).....	22
2.3.3 Revestimento	25
2.3.4 Vantagens e outras aplicações dos sensores acústicos	25
2.4 Biossensores e métodos bioanalíticos.....	26
2.4.1 Sistemas de Injecção em Fluxo	27
2.4.2 Componente biológica	28
2.5 Imobilização de biocatalisadores.....	30

2.5.1 Vantagens de imobilizar biocatalisadores	30
2.5.2 Tipos de imobilização	31
2.5.2.1 Reticulação com agentes bifuncionais.....	33
2.5.2.2 Ligação a um suporte – por ligação covalente.....	34
Método de sol-gel	35
Silanização em meio orgânico	37
2.5.2.3 Confinamento- oclusão em alginato de cálcio.....	38
3. Materiais e métodos.....	39
3.1 Reagentes e Aparelhagem.....	41
3.2 Síntese e preparação do revestimento biológico. Aplicação do revestimento biológico e químico.....	42
3.2.1 Método de aplicação do revestimento químico	42
3.2.2 Preparação e aplicação do revestimento biológico	43
3.3 Montagem experimental e metodologias analíticas	45
3.3.1 Sistema utilizando um biossensor com dupla camada: química e biológica.....	45
3.3.2 Sistema para análises em Injecção em Fluxo.....	46
3.3.3 Preparação do biorreactor	47
3.3.3.1 Preparação do biorreactor 1.0 : Confinamento do biocatalisador em contas de alginato de cálcio.....	47
3.3.3.2 Preparação do biorreactor 2.0: funcionalização de esferas de vidro.....	48
Silanização em meio orgânico	49
3.3.3.3 Preparação do biorreactor 3.0: Funcionalização das paredes de um capilar.....	50
Silanização pelo Método sol-gel.....	50
3.3.4 Sistema de análise em gases	51
4. Resultados e discussão	53
4.1 Teste de possíveis interferentes.....	55
4.2 Resultados obtidos utilizando um biossensor com dupla camada: química e biológica...55	
4.2.1 Optimização do sistema	55
4.2.1.1 Volume do tampão	55
4.2.1.2 Composição do revestimento biológico	56
4.2.2 Respostas do biossensor à acetamida	57
4.3 Sistema para análises em Injecção em Fluxo.....	59
4.3.1 Biorreactor 1.0: Confinamento do biocatalisador em alginato de cálcio.....	60

4.3.1.1	Teste da conversão da acetamida pelo biocatalisador imobilizado.....	60
4.3.1.2	Optimização do empacotamento das contas de alginato de cálcio.....	60
4.3.1.3	Respostas do método bioanalítico à acetamida	61
4.3.2	Biorreactor 2.0: funcionalização de esferas de vidro	62
4.3.3	Biorreactor 3.0: funcionalização das paredes de um capilar	63
4.3.3.1	Resposta do método bioanalítico à acetamida com funcionalização das paredes do capilar pelo método sol-gel.....	64
4.3.3.2	Resposta do biossensor á acetamida com funcionalização das paredes do capilar em meio orgânico	70
4.4	Sistema de análises em gases	71
5.	Conclusões e perspectivas futuras	73
6.	Bibliografia	78

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura da acetamida.	5
Figura 2: Estrutura da Acrilamida.	8
Figura 3: Formação da acrilamida a partir da aspargina e glucose.	11
Figura 4: A- Estrutura cristalina do quartzo com eixos atribuídos. B- Orientação do corte AT [60].	23
Figura 5: Cristal com eléctrodos de ouro.	24
Figura 6: Representação do homo-hexámero da Amidase, A e C- estrutura da Amidase vista de dois ângulos diferentes, B- representação da superfície do hexámero em contacto com o solvente, D- representação esquemática do hexámero, realçando o empacotamento dos monómeros [77].	29
Figura 7: Reacção entre a Acetamida e a Amidase, dando origem ao ácido acético e amoníaco [73].	30
Figura 8: Métodos de imobilização de biocatalisadores. [Adaptado de [79, 80]]	31
Figura 9: Aspectos a considerar na escolha de um suporte para imobilização	32
Figura 10: Reacção química de uma enzima e GA.	34
Figura 11: Funcionalização de uma superfície de vidro: A- silanização (adição de APTS), B- adição de GA, C- adição de uma proteína.	35
Figura 12: Reacção de hidrólise e condensação de alcoxissilanos por catálise ácida. [ADAPTADO DE [86]]	36
Figura 13: Esquema do processo de silanização de uma superfície de vidro. A- primeira silanização com APTS, B- segunda silanização (capping).	37
Figura 14: Spin Coater	43
Figura 15: A - Representação do cristal com duplo revestimento,	45
Figura 16: Célula do cristal,	46
Figura 17: Montagem do sistema de Análise em injeção em fluxo. A- Manómetro , B- Garrafa pressurizada com tampão, C- Rotâmetro, D – Válvula e porta de injeção com loop da amostra, E- Biorreactor, F- Célula do cristal em PVC, G- Oscilador, H- Fonte de Alimentação, I- Frequencímetro, J- Computador	47
Figura 18: Esquema da estrutura do biorreactor, A- conta de alginato de cálcio, B – esfera de vidro.	48
Figura 19: Biorreactor 1.0 inserido no sistema, A - conta de alginato de cálcio com extracto celular, B- esfera de vidro, C- lâ de vidro nas extremidades do tubo.	48
Figura 20: Frequência antes e após adição de acetamida.	56
Figura 21: Variação da frequência após injeção de 280 µL de acetamida 1000 ppm	58
Figura 22: Recta de calibração relativa à variação de frequência vs concentração de acetamida.	58
Figura 23: Variação da frequência para diferentes tempos de reacção entre contas de alginato de cálcio e uma solução de acetamida 400 ppm.	60
Figura 24: Variação da frequência para diferentes concentrações de Acetamida.	61
Figura 25: Respostas obtidas após injeção de vários padrões a várias velocidades e com várias quantidades de revestimento químico.	63
Figura 26: Variação da frequência após injeção do padrão de	63

Figura 27: Respostas à acetamida obtidas ao longo de 6 dias de análise. Biorreactor com a- 3 dias, b- 4 dias, c- 5 dias, d-6 dias, e-10 dias, f-14 dias.	66
Figura 28: Curvas de calibração para o 6º e 7º dia de análise	66
Figura 29: Gráfico representando o decréscimo da resposta do biossensor aos padrões com o passar dos dias.	67
Figura 30: Respostas obtidas com a injeção de vários padrões de acetamida: 108,04; 97,28; 97,28; 76,67 e 86,42 ppm. Os sinais são correspondentes aos últimos cinco pontos da recta de calibração do gráfico c na Figura 27.	68
Figura 31: Resposta obtida após injeção do padrão de acetamida de 75,7 ppm.	68
Figura 32: Respostas obtidas após injeção de vários padrões de acetamida nos dias a-2, b- 3 e c -4 de análise, correspondentes aos dias 4, 6 e 7 após a preparação da coluna, para o primeiro capilar.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1: Teores de acrilamida para alguns alimentos [adaptado de [16]].	10
Tabela 2: Informações sobre a acrilamida retiradas da NP 1796:2007 [[39], página 10]	14
Tabela 3: Resumo de alguns métodos de análise de acrilamida em diversas amostras.....	18
Tabela 4: Reagentes usados.....	41
Tabela 5: Aparelhagem usada.....	42
Tabela 6: Valores da variação da frequência relativos à adição de acetamida em diferentes concentrações.	58
Tabela 7: Variação da frequência obtida com a injeção da mistura reaccional ao longo de 6 minutos	60

Siglas

AESA	Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos
APTS	3-Aminopropiltriethoxissilano
BSA	Bovine serum albumin/ Albumina de soro bovino
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CMPAA	Comité Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares
CIAA	Confederação de Indústrias Agro-Alimentares
EPA	Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency)
FAO	Organização para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization)
GA	Glutaraldeído
Hb	Hemoglobina
IARC	Agência Internacional para pesquisa do Cancro (International Agency for Research on Cancer), faz parte da OMS
MCQ	Microbalança de Cristais de Quartzo
OEL	Limite de Exposição Ocupacional (Occupational Exposure Limit)
OMS	Organização Mundial de Saúde (WHO World Health Organization)
PAA	Poliacrilamida
RSR	Razão sinal ruído
SNC	Sistema Nervoso Central

1. Introdução

Algumas amidas como acetamida e acrilamida estão presentes no nosso quotidiano sob várias formas: polimerizadas, *N*-substituídas ou na forma livre. Podem ser detectadas em alimentos, água, cosméticos e embalagens. Uma exposição prologada ou a elevadas quantidades pode pôr em risco a saúde dos consumidores principalmente devido ao seu carácter carcinogénico.

Apesar da sua toxicidade não são analisadas por rotina. Para a sua quantificação são geralmente usadas técnicas de separação cromatográficas (GC, HPLC) associadas a detectores como UV, MS, FID, NPD e ECD. Existem também alguns biossensores amperométricos e potenciométricos com base na interacção da acrilamida com enzimas e hemoglobina. Até ao dia de hoje, há poucos métodos para analisar a acetamida na sua forma livre.

O objectivo desta tese é desenvolver um biossensor acústico para amidas. Pretende-se criar um instrumento que possa ser facilmente utilizado e sem grandes custos.

Sabe-se que a enzima amidase (acilamida amido-hidrolase E.C.3.5.1.4) presente nas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* L10, converte amidas alifáticas em compostos menos tóxicos como amoníaco e os respectivos ácidos carboxílicos. Pretende-se associar esta componente biológica a um sensor acústico com um revestimento químico sensível ao amoníaco/ião amónio.

Testaram-se vários métodos de imobilização, tanto com células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10 como com o respectivo extracto celular, em diferentes suportes. Começou-se por depositar o biocatalisador sobre o revestimento químico no cristal através da reticulação com glutaraldeído (GA). Decidiu-se posteriormente separar a componente química da biológica, imobilizando o biocatalisador num biorreactor inserido num sistema de injeção em fluxo (FIA) tendo como detector um sensor acústico sensível

ao ião amónio. Neste sistema, testaram-se outros tipos de imobilização. Confinou-se o extracto celular em contas de alginato de cálcio e imobilizou-se o biocatalisador em esferas de vidro e paredes de capilares silanizados. O processo de funcionalização incluiu a silanização do suporte com um aminossilano (APTS) e a imobilização do biocatalisador com GA. Testou-se a silanização pelo método sol-gel e com solventes orgânicos.

2. Fundamentos teóricos

2.1 Amidas e a sua Importância

As amidas são derivados de ácidos carboxílicos, para além de um grupo acilo $R-C=O$, contêm um grupo amina $-NH_2$. Quando o grupo amina está na forma $-NH_2$ a amida é primária, quando os hidrogénios são substituídos podem dar origem a amidas secundárias e amidas terciárias.

Estes compostos têm várias aplicações, com as quais estamos em contacto. Fazem parte de vários materiais devido à sua capacidade de polimerização, são usados como solventes (no caso da amidas de baixo peso molecular) [1], aparecem em bebidas alcoólicas como cerveja e vinho [2] entre muitas outras fontes.

As amidas são abundantes nos organismos vivos, fazendo parte de proteínas e ácidos nucleicos e estão presentes em alguns medicamentos. Esta forte presença deve-se à estabilidade das amidas nas condições fisiológicas [1]

De seguida, serão abordadas mais especificamente duas amidas: acetamida e acrilamida. O interesse destas amidas deve-se à sua toxicidade e abundância.

2.1.1 Acetamida

Segundo a terminologia IUPAC, a etanamida representada na Figura 1, é um derivado do ácido acético. À temperatura ambiente apresenta-se sob a forma de cristais incolores e higroscópicos [3]. É solúvel em água formando pontes de hidrogénio.

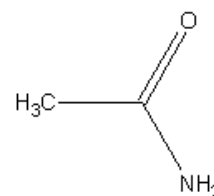


Figura 1: Estrutura da acetamida.

2.1.1.1 Fontes

A acetamida encontra-se no nosso quotidiano sob várias formas. É encontrada em águas residuais, podendo provir de efluentes industriais pois é aplicada como solvente, solubilizador, plastificante, agente desnaturante e usada em sínteses orgânicas. Quando libertada para águas fluviais, não é adsorvida nas partículas em suspensão nem nos sedimentos; não tem tendência a volatilizar-se nem ocorre bioacumulação nos organismos [3]. Alguns compostos com grupos “nitrilo” e derivados são recorrentemente usados na indústria e por isso, muitas vezes aparecem em efluentes que contaminam as águas. Foram desenvolvidos métodos para a sua remoção, dada a sua toxicidade para o ambiente. Um dos métodos tem como base a conversão destes compostos por parte de bactérias em compostos menos tóxicos, podendo a acetamida ser um deles [4].

Este composto pode também ser libertado para a atmosfera onde é fotoquimicamente degradado.

Quando presente no solo, sob a forma de herbicidas ou fungicidas, apresenta elevada solubilidade em água, tendo assim uma grande mobilidade o que leva a infiltrações nos cursos de água existentes [5-7].

Faz parte da composição de vernizes, explosivos, têxteis e alguns medicamentos como pomadas para cicatrização de queimaduras. O composto MEA - acetamida monoetanol amina, é constituinte de alguns cosméticos, no entanto, a acetamida livre está presente em quantidades vestigiais [8].

2.1.1.2 Toxicologia

A toxicidade de um composto, é determinada pelos seus parâmetros físico-químicos tal como a susceptibilidade individual do organismo exposto, como idade, sexo, sistema imunitário, entre outros. A forma em que o agente químico se encontra (estado físico), vai determinar o modo de interacção com o organismo. Exemplificando: aerossóis têm

tendência a acumular-se no sistema respiratório, precisam de ser dissolvidos nos fluidos biológicos para interagir com outras áreas do organismo; uma solução com o mesmo composto, tem maior facilidade em entrar na corrente sanguínea através da absorção pela pele. No caso da acetamida, pode haver exposição ocupacional por inalação (aerossóis) ou dérmica, em postos de trabalho onde é usada ou produzida. Quando aquecida produz gases tóxicos que ao serem inalados pelo Homem também podem trazer más consequências [9].

A toxicidade de um composto pode também ser avaliada segundo a duração da exposição e concentração do mesmo, podendo ter efeitos agudos, quando o organismo é exposto a uma elevada concentração num curto espaço de tempo ou crónicos quando é exposto durante um longo período a baixas concentrações. A acetamida tem como efeitos agudos irritação dérmica, respiratória e ocular, e como efeitos crónicos aumento do risco de incidência de tumores [5].

2.1.1.3 Legislação

O carácter carcinogénico da acetamida é desde 1974 defendido pela Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) [10]. Ao longo dos anos foram-se estudando os seus efeitos em várias espécies, podendo-se afirmar que o composto é possivelmente carcinogénico para o Homem, enquadrando-se no grupo 2B ou C segundo a IARC [11-12] ou a Agência de Protecção Ambiental (EPA) [13], respectivamente. Sabe-se também que cerca de 64-72% do composto ingerido é excretado pela urina e expiração sendo apenas 30% metabolizado [12].

Em 2006, o Comité Misto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares (CMPAA) proibiu o uso de acetamida, usada como um agente aromatizante (FL 16.047). Apesar do mecanismo de formação dos tumores em ratinhos não ser claro, a probabilidade do seu carácter genotóxico (tóxico para o DNA) é grande [14].

2.1.2 Acrilamida

A acrilamida é um composto vinílico, pois tem na sua constituição o grupo vinílico ($\text{CH}_2=\text{CH}-$), neste se dá a ligação entre várias moléculas dando origem a polímeros como poliacrilamida. Segundo a terminologia IUPAC designa-se por 2-propenamida. Figura 2. Encontra-se à temperatura ambiente sob a forma de cristais

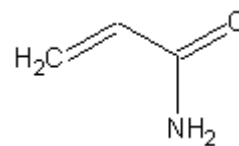


Figura 2: Estrutura da acrilamida.

incolores e higroscópicos. É bastante hidrofílica, pouco estável podendo ser explosiva. Forma amoníaco (NH_3) quando decomposta não termicamente e quando aquecida produz monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2) e óxidos de azoto (NO, NO_2) [15].

A acrilamida tem dois locais activos, a ligação dupla conjugada e o grupo amida. A ligação dupla sendo electrofílica pode participar em reacções nucleofílicas com grupos funcionais com hidrogénios activos, isto é, grupos tiol ($-\text{SH}$) de aminoácidos como a cisteína, grupos amina de aminoácidos livres ($\alpha\text{-NH}_2$ e $\epsilon\text{-NH}_2$ no caso da lisina), *N*-terminais de resíduos de proteínas e o grupo amina da cadeia lateral da histidina. Nestas reacções ocorre formação de uma ligação $-\text{C-N}-$ ou $-\text{C-S}-$ com a cedência de electrões a partir do nucleófilo. Com estas reacções a acrilamida age como um agente alquilante podendo formar aductos com proteínas como a Hemoglobina, enzimas e mesmo DNA [15].

2.1.2.1 Fontes

É menos frequente encontrar acrilamida na sua forma livre, pois na grande parte das suas aplicações é usada na forma polimerizada, como a poliacrilamida e outros copolímeros. Devido à possível despolimerização pode-se encontrar acrilamida em quantidades vestigiais. Os polímeros não são tóxicos, o risco advém das quantidades residuais do monómero, quando usado em produtos que estão em contacto directo com o consumidor (água, cosméticos, alimentos). A poliacrilamida tem aplicações na indústria petrolífera, têxtil, papelaria, cosmética, sendo também componente de embalagens para

alimentos, tintas e produtos agrícolas [16]. Encontra-se este polímero e outros copolímeros da acrilamida em resíduos provenientes de tratamento de águas, pois são usados como floculantes, facilitando a filtração das partículas mais pequenas.

A acrilamida tem também aplicações na investigação científica. O gel de poliacrilamida é extensivamente usado em Electroforese, técnica usada para separação de proteínas. Funciona como quencher em análises de fluorescência com proteínas com resíduos de Triptofano e Tirosina. Certos estudos provam que os grupos tiol têm 100-300 vezes mais reactividade com acrilamida do que os outros grupos amida [17]. Por isso, é usada para localizar ligações tiol e na determinação da sequência de aminoácidos [18].

Há um grupo de correctivos de solos e aditivos de pesticidas (Glifosato) que contêm poliacrilamida. Foram feitos estudos que mostram que a despolimerização é afectada pela luz e temperatura, levando à contaminação dos solos, águas fluviais e subterrâneas [19-20].

É possível ainda encontrar acrilamida no fumo do tabaco [21], no refinamento de açúcar [22], em ligantes de cimentos, argamassas e pode também ser formada na presença de certos microorganismos que convertem enzimaticamente acrilonitrilo [17].

Em 2002, a Autoridade Nacional de Alimentação Suéca lançou um alarme a nível mundial afirmando que quantidades significativas de acrilamida se encontravam em vários produtos alimentares. Estudos revelaram quantidades acima de 3mg/kg de acrilamida em alimentos derivados de plantas após o seu processamento. Houve uma grande preocupação por parte dos governos para verificar as quantidades do composto a que a população estava a ser exposta, perceber o seu mecanismo de acção e descobrir quais os precursores nos alimentos não processados. São continuamente realizados estudos epidemiológicos e toxicológicos e são procuradas novas formas de processamento de alimentos para reduzir as quantidades de acrilamida formada. É possível observar na Tabela 1 a quantidade preocupante de acrilamida em alguns alimentos.

Tabela 1: Teores de acrilamida para alguns alimentos [adaptado de [17]].

Alimento	Acrilamida (µg/kg=ppb)
Produtos de panificação: pão, bolos	70-430
Bolachas, crackers	30-3200
Cereais de pequeno-almoço	30-1346
Batatas fritas	170-3700
Batatas fritas palito ou em tira (French-fried potato)	200-12000
Batata cozida	48
Café em pó	15-90

Foram publicados vários estudos sobre o mecanismo de formação deste composto nos alimentos. Contudo, não é possível concluir por uma única via de formação [23]. Uma das mais estudadas envolve a presença de glucose como açúcar redutor e aspargina a elevadas temperaturas (acima de 120 °C). Sabe-se que há um aumento de formação na presença de água [24]. A reacção dá-se entre o grupo amina da aspargina e o grupo carbonilo do açúcar redutor, tal como se pode ser na Figura 3. Há uma maior formação de acrilamida em alimentos ricos em hidratos de carbono do que nos que são ricos em proteínas, apesar de se pensar que a aspargina é o maior precursor deste composto [17]. Os alimentos com um maior teor deste aminoácido na sua forma livre são os derivados de plantas (cereais) e batatas [23], como é possível verificar pela tabela 1.

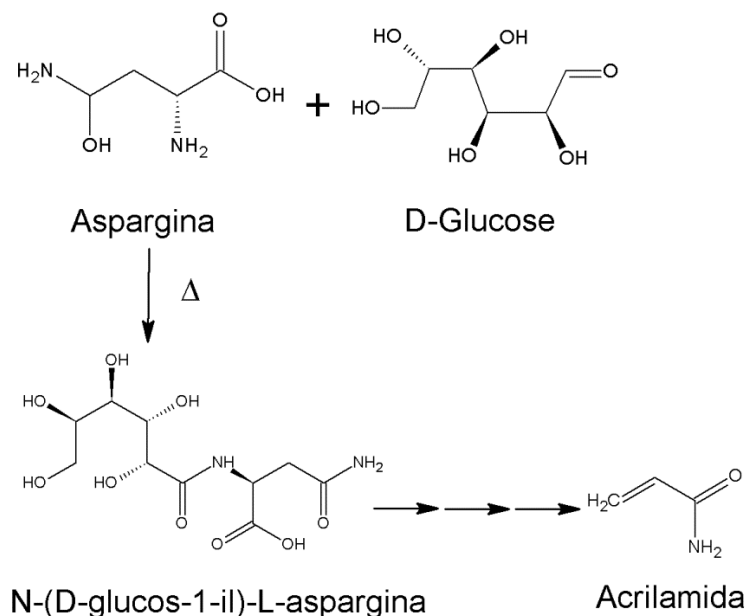


Figura 3: Formação da acrilamida a partir da asparagina e glucose.

2.1.2.2 Toxicologia

Devido à forte presença da acrilamida no quotidiano do ser Humano e animais, este composto foi extensivamente estudado. A maioria dos estudos é feita em ratos de laboratório através da toma de doses controladas deste composto. As conclusões acerca dos riscos associados são feitas assumindo que é possível extrapolar as taxas de resposta tumoral da espécie em estudo para as do Homem e que a resposta a elevadas doses pode ser extrapolada para doses baixas. Há estudos recentes acerca das diferenças toxicinéticas e toxidinâmicas entre o Homem e o rato que alteram a extrapolação dos resultados até então obtidos [25]. Uma das conclusões a que se chegou foi a menor conversão de acrilamida a glicidamida (metabolito tóxico) no Homem que no rato, ao contrário do que se pensava antes, vindo por isso diminuído o risco no Homem [26].

A acrilamida pode ser inalada, ingerida e absorvida dermicamente, sendo tóxica e irritante. Provoca irritações nas mucosas, pele e olhos. Estes são os efeitos do ponto de vista agudo. Tem também um efeito neurotóxico, isto é, induz neuropatias devido à degeneração dos nervos terminais e espinal medula, sendo os sintomas relacionados com

nervos motores e sensoriais [9]. Verificam-se dificuldades na memorização, sonolência e tonturas. Foram estudados também efeitos no sistema ocular e reprodutivo. Uma das explicações para este efeito está relacionado com o carácter anfipático da acrilamida, enquanto que o grupo vinílico ($\text{CH}_2=\text{CH}-$) interage hidrofobicamente com a bicamada lipídica das membranas celulares, o grupo $-\text{CONH}_2$ pode formar ligações de hidrogénio com componentes da célula (proteínas, DNA). Deste modo, torna-se possível a entrada deste composto nas células nervosas [17].

Uma das maiores preocupações derivadas da exposição à acrilamida é o seu efeito carcinogénico. Existem vários estudos relacionados com a formação de vários tipos de tumores como no esófago [27], nos rins [28], nos ovários, no endométrio [29], entre outros.

Enquanto o manuseamento de acrilamida no laboratório é realizado com os devidos cuidados, em ambientes agrários e de construção civil apesar de estar presente em maiores quantidades, o incumprimento de regras de segurança leva a que se verifique um maior número de envenenamentos [30, 31].

Como foi referido anteriormente, a acrilamida forma aductos com a Hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigénio e dióxido de carbono no organismo. Bergmark [32] estudou a quantidade desses aductos em várias pessoas, tendo encontrado níveis de 31 pmol/g nos não fumadores, (acrilamida proveniente da dieta); 116 pmol/g nos fumadores, e 54 pmol/g nas pessoas que contactavam com o composto no local de trabalho.

O último relatório da CMPAA (2010) relativo à acrilamida na dieta, conclui que não existem dados suficientes para afirmar que o seu consumo proveniente dos alimentos processados põe em risco a saúde dos consumidores. Contudo, há evidências da sua toxicidade, os esforços feitos nas indústrias para reduzir a formação do composto parecem ter tido resultados positivos e as investigações vão continuar [33].

2.1.2.3 Legislação

Segundo a directiva 1999/45/CE, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos estados-membros respeitantes à classificação, embalamento e rotulagem das preparações perigosas, qualquer produto que contenha mais de 0,1 % (m/m) de acrilamida é classificado como pertencente à categoria 2 de carcinocidade. Para além disso, o composto é classificado como explosivo, tóxico, irritante, mutagénico e afecta os órgãos reprodutivos [34]. Ainda este ano, a agência europeia das substâncias químicas altera a classificação referente ao carácter carcinogénico para a categoria 1B, relativa a substâncias que foram cientificamente provadas ser carcinogénicas para o Homem [35].

Foram aparecendo recomendações referentes à avaliação do risco e estratégias de redução da acrilamida de modo a haver um maior controlo no ambiente laboral [36]. A recomendação da comissão 2010/307 [37], relativa à monitorização dos teores de acrilamida nos alimentos recomenda procedimentos de amostragem, análise e caracterização das amostras. No seguimento desta recomendação devem ser considerados vários aspectos, tal como a recomendação 2007/331/CE [38], relativa ao controlo de acrilamida nos alimentos que estabelece um programa trienal (2007-2009) para a sua análise; os resultados foram compilados pela autoridade europeia para a segurança de alimentos (AESA). A confederação das indústrias agro-alimentares (CIAA), desenvolveu formas de baixar os teores deste composto nos seus produtos e a indústria alimentar e os estados-membros estão a desenvolver esforços no sentido de investigar os processos de formação de acrilamida e as formas de reduzir os teores desta substância nos alimentos. Para se poder monitorizar o impacto destes esforços, recomenda-se a recolha de dados, que terão de ser enviado anualmente à AESA.

Limites legais

Existe alguma legislação relativamente a limite legais para a acrilamida nas suas várias aplicações/fontes.

Segundo a NP 1796:2007 [39], a média ponderada (MP) do valor limite de exposição (VLE) é a concentração média dum agente químico presente no ar de um local de trabalho para um dia de 8 horas e uma semana de 40 horas, à qual não são desenvolvidos efeitos prejudiciais na saúde de trabalhadores expostos diariamente. No caso da acrilamida, é através da via cutânea (incluindo mucosas) que há uma maior exposição, tendo de ser tomadas medidas de protecção adequadas. Quando é este o tipo de exposição mais importante dá-se a notação de toxicidade percutânea (P). A notação A3 é dada a um composto considerado “Agente carcinogénico confirmado nos animais de laboratório com relevância desconhecida no Homem”. Ou seja, em doses elevadas e directamente injectadas em órgãos-alvo, são agentes carcinogénicos em animais de laboratório. No entanto, nem sempre se pode associar os mecanismos e as alterações histológicas à exposição ocupacional, e os estudos epidemiológicos não confirmam o aumento de risco da patologia em humanos expostos. Por isso, não se pode afirmar que a acrilamida é um agente carcinogénico, salvo improváveis modos de exposição e a elevadas concentrações. Tal como foi referido anteriormente, um dos alvos deste composto é no sistema nervoso central (SNC). Na Tabela 2 sumarizam-se as classificações da acrilamida em termos de toxicidade e apresenta-se o VLE.

Tabela 2: Informações sobre a acrilamida retiradas da NP 1796:2007 [[39], página 10]

Substância	VLE-MP	Notação	Base do VLE
Acrilamida	0,03 mg/m ³	P, A3	Afecção do SNC

Em 2008 a organização mundial de saúde (WHO) lançou a terceira edição de um documento com as linhas orientadores para a qualidade da água para consumo. Neste documento o limite estipulado para a acrilamida na água e materiais em contacto com a água de consumo é de 0,5 µg/L [40].

O valor limite para acrilamida ou fontes de acrilamida livre (ex: *N*-metilaloacrilamida) em preparações de caldas de injeção é de 0,1% (m/m) no processo de preparação da calda de injeção [35].

2.2 Métodos de análise de amidas

2.2.1 Análise de Acetamida

A acetamida tendo um baixo peso molecular acarreta algumas dificuldades na sua separação de outros compostos com peso molecular semelhante. Não tem nenhuma banda de absorção no infravermelho (IR) ou ultravioleta (UV) intensas, o que complica a sua detecção em baixas quantidades. Por último, a sua baixa volatilidade pode limitar a análise deste composto em Cromatografia Gasosa (GC), quando presente em baixas concentrações. Não obstante estas características, foram desenvolvidos alguns métodos de detecção de acetamida em diferentes amostras.

A acetamida é usada na indústria para vários fins, por isso, há a possibilidade de ela se encontrar na atmosfera destes locais de trabalho. Em 1990 a EPA sugeriu uma série de métodos de análise de compostos perigosos no ar, entre os quais um método de análise para a acetamida. As amostras são armazenadas em tubos de sílica gel, que irão ser desorvidos com metanol e analisadas por GC-NPD (cromatografia gasosa com detector de azoto e fósforo). O limite de detecção deste método é de 0,4 ppm. Este método tem como interferentes compostos com tempos de retenção muito semelhantes à acetamida [41].

Diekmann *et al.* [42] desenvolveram um método de análise da acetamida e acrilamida, em gases, usando como amostra fumo de tabaco. A análise é feita em GC-MS (cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa) com injeção directa na coluna. Usaram a adição de padrões internos para ambos os compostos, sendo estes os respectivos isótopos deuterados. O limite de detecção do método é de 70 ng/ml para

acetamida e 32 ng/ml para acrilamida. Este método tem como desvantagens o longo tempo de análise e o facto do equipamento e os reagentes deuterados serem caros.

A acetamida é usada na indústria farmacêutica, em síntese química por isso, pode aparecer como uma impureza nos fármacos. Foi desenvolvido um método de análise para detectar precisamente este tipo de impurezas através de HPLC com interacção hidrofílica associada a um detector UV [43]. Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é polar e a fase móvel tendencialmente apolar (mistura de um solvente polar e outro apolar). Conseguiram melhores resultados usando uma coluna de sílica. Contudo, com esta fase estacionária, o risco de adsorção irreversível da amostra é maior relativamente às colunas de fase reversa, sendo também mais reactivas e estando mais expostas à erosão causada pela passagem da fase móvel. Para além destes factores, o tipo de amostra que é injectada na coluna também vai influenciar o seu tempo de vida.

A maior parte das análises não tem por objectivo a determinação da acetamida livre. Na verdade, a maior parte das aplicações, a acetamida está polimerizada. Para além disso, o grupo amina é muitas vezes substituído e mesmo que ocorra despolimerização, não está na forma livre, e é comum associar-se o nome acetamida sempre que há um terminal $-\text{CH}_2\text{CONR}_2$ ou $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ num composto. Compostos como dimetil acetamida e dicloro acetamida são exemplos destes dois casos. Há um grupo de herbicidas da família da acetamida, onde também não existe o composto na forma livre, mas sim derivados deste, como acetocloro, alacloro, propacloro, metacloro, propancolo, flufenacet [44].

Como é possível verificar pelas poucas alternativas de análise que se podem encontrar nos exemplos referidos anteriormente é difícil encontrar um método de análise de acetamida na sua forma livre.

2.2.2 Análise de Acrilamida

Uma vez que a acrilamida é mais tóxica do que a acetamida os trabalhos publicados sobre a sua detecção são em maior número.

Os métodos analíticos mais usuais para a análise de acrilamida, tal como os seus metabolitos na urina, plasma e tecidos são a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectroscopia de massa (MS) e a combinação desta com as duas primeiras. Ao longo do tempo foram aparecendo vários métodos com recurso as estas técnicas de separação associadas a outros detectores.

Na Tabela 3 estão resumidos alguns dos métodos mais citados na bibliografia sobre a análise de acrilamida em vários tipos de matrizes. Como foi referido na secção anterior, a acrilamida despolimerizada proveniente de floclulantes, pesticidas ou correctores de solo pode contaminar as águas tratadas tais como os cursos de água existentes devido à sua elevada mobilidade. Para o controlo deste tipo de contaminação a EPA publicou dois métodos de análise apropriados para esta simples matriz sendo estes HPLC – UV [45] e GC/ECD. [46]. Outro caso de despolimerização de polímeros contendo acrilamida ocorre no refinamento do açúcar. Desenvolveu-se um método de análise para se verificar a quantidade do monómero residual [47], no entanto, há estudos que revelam que quantidades de 5 µg/kg (abaixo do limite de detecção) podem trazer riscos para o consumidor [48].

Tabela 3: Resumo de alguns métodos de análise de acrilamida em diversas amostras

Técnica	LD	Gama linear	Amostra	Comentários	Referência
HPLC-UV.	10 µg/L	1-10 mg/mL	Águas isentas de matéria orgânica	-	Método 831 EPA [45]
GC/ECD	0,032 µg/L	0-5 µg/L	Água do mar, rio e esgoto	Derivatização e purificação demorada (pelo menos 1h)	Método 8032A EPA [46]
HPLC-MS (fase reversa)	200 µg/kg	-	Açúcar	Derivatização e purificação demorada (pelo menos 1h)	[47]
HPLC-UV (fase reversa)	0,05µg/ml	0,1-100 µg/ml	Plasma de rato	Perda de acrilamida devido à sua ligação às proteínas.	[49]
HPLC-MS-MS	30 mg/kg	-	Alimentos processados: batatas fritas e cereais	Padrão interno deuterado, sem recurso a derivatização,	[50]
HPLC-MS-MS	0,1 µg/kg	10-500 µg/kg	Alimentos processados: arroz, pão, batatas fritas, biscoitos e café	Padrão interno e de recuperação deuterados, sem recurso a derivatização	[51]
Py-GC/MS	-	-	-	Não há pré-tratamento da amostra	[23]
RMN ¹H	0,5 mg/L	-	Solos e lamas	Baixa recuperação a concentrações mais baixas (70% a 5 mg/L) devido à adsorção do polímero nas partículas não sendo assim detectável, tempos de análise demorados	[6]
Sensor acústico	10 µg/kg	2-10 mg/kg	Padrões no estado gasoso	Cristal revestido com macrociclos tetralactâmicos do tipo Hunter/Vogle As análises foram apenas feitas com padrões de acrilamida	[52]

Em alguns casos, derivatizou-se a acrilamida na ligação dupla formando um dibromo para se analisar por GC [44] ou HPLC [46]. Nestes casos é necessário proceder a uma purificação após a derivatização com o objectivo de eliminar impurezas dos reagentes usados. Mesmo assim, com este tipo de derivatização as técnicas podem apresentar alguma irreprodutibilidade e baixas taxas de recuperação.

Relativamente à análise de acrilamida nos alimentos, a matriz em questão é mais complexa, tendo de se eliminar interferentes e contaminantes na extracção e purificação. Estes dois passos são essenciais para a qualidade e fiabilidade das análises. Começaram a surgir técnicas onde se adicionava à amostra a ser analisada um padrão interno. Este serve para eliminar interferências de matriz e corrigir a irreprodutibilidade na injeção da amostra em GC, reduzindo assim as discrepâncias entre os resultados obtidos por GC e HPLC. Em certos casos, a adição de padrão interno serve para melhorar a quantificação da acrilamida, como quando o rendimento da extracção varia.

Rosen e Hellenas [50] usaram um padrão interno e HPLC-MS/MS. Adicionaram D3-acrilamida como padrão interno, antes da extracção. A purificação foi feita através duma coluna de extracção em fase sólida com posterior ultrafiltração, e a análise foi feita numa coluna de carbono poroso grafitizado. A partir deste método, outros foram aparecendo com algumas variações principalmente no passo da purificação. Kim, Hwang *et al.* [51] adicionaram outra particularidade ao seu método, um padrão de recuperação. Usaram como padrão interno $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida e D₅-3-cloropropanediol como padrão de recuperação (solúvel em água, tempo de retenção próximo do da acrilamida, espectro de massa diferente). A amostra foi previamente extraída com água e centrifugada, para depois ser eluída numa coluna de fase reversa (purificação) e finalmente analisada em HPLC-MS/MS. O padrão interno foi adicionado antes da extracção e o padrão de recuperação antes da purificação. Apesar das quantidades dos compostos variarem ao longo do tempo, a razão dos três manteve-se constante e deste modo foi possível calcular as perdas do analito.

A técnica que permite a análise de acrilamida tal como estudar o seu mecanismo de formação é a Py-GC/MS. A amostra não precisa de pré-tratamento e é isotópicamente marcada. É injectada num sistema pirolítico onde está sujeita a elevadas temperaturas ocorrendo directamente a derivatização [23].

A desvantagem em recorrer às técnicas de GC e HPLC é o facto de serem necessários consideráveis volumes de gases ou solventes para a eluição e dos tempos de separação serem longos. Quando necessário, o procedimento de derivatização também requer o uso de reagentes tóxicos, que se não forem eliminados numa posterior purificação contaminam a amostra. Muitas vezes o procedimento de extracção, derivatização e purificação é demorado.

Nestes últimos anos foram aparecendo métodos de análise baseados em biossensores. Recorrendo a biomoléculas ou microorganismos, começou a ser possível quantificar acrilamida em alimentos e efluentes industriais. A determinação de aductos de hemoglobina (Hb) e acrilamida é um meio de analisar a exposição a este composto, funcionando o aducto como um biomarcador. Foram desenvolvidos vários sensores amperométricos imobilizando Hb nos eléctrodos [53-55]. As medições foram feitas com base na redução da proteína quando estava em contacto com acrilamida. Estes biossensores foram aplicados em alimentos, atingindo limites de detecção de 10^{-10} M. Em alguns casos o biossensor tem a desvantagem de não poder ser reutilizado [53].

Foi desenvolvido um biossensor no formato de kit baseado na hidrólise da acrilamida por parte da amidase de *Sulfolobus solfataricus* e posterior detecção do ião amónio por espectrofotometria. Antes desta detecção, ocorre uma reacção com outra enzima e duas extracções por SPE, aumentando assim o tempo de análise das amostras. Tem um gama linear de 0,025-1 mg/kg e um limite de quantificação de 25 µg/kg. Este não é um método específico para acrilamida, por isso é necessário haver uma especial atenção aos interferentes [56].

Silva *et al.* [57] desenvolveram um biossensor potenciométrico com base na reacção da amidase com amidas para aplicar em efluentes industriais. No eléctrodo foi aplicada uma membrana onde tinham sido imobilizadas células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10. Estas células contêm a enzima responsável pela conversão de amidas no respectivo ácido carboxílico e em ião amónio que foi detectado por um eléctrodo selectivo. O biossensor tem uma durabilidade de 54 dias, um limite de detecção de $4,48 \times 10^{-5}$ M e uma gama linear de $0,1 - 4,0 \times 10^{-3}$ M. É reutilizável e tem um tempo de resposta de 55 segundos. Neste tipo de biossensores a sensibilidade é dependente da transferência de massa do analito para o eléctrodo que por sua vez é afectada pela presença de uma membrana com biocatalisadores imobilizados. Esta membrana não só afecta a resposta do sensor mas também a recuperação do mesmo [58]. Para além disso os sensores potenciométricos respondem à actividade e não à concentração do analito e a força iónica é geralmente desconhecida nas amostras. A dependência entre o potencial e a actividade é logarítmica daí que possa ter alguma vantagem substituir o sensor potenciométrico por um sensor acústico.

2.3 Sensor Acústico

Face ao custo elevado dos instrumentos para determinar amidas, especificamente acetamida e acrilamida e as dificuldades referidas na sua análise a hipótese de desenvolver um sensor químico, barato, mas fiável surge como um imperativo. Dentro dos sensores químicos os sensores de massa são neste caso, especialmente apelativos.

Um sensor químico é um instrumento analítico que produz um sinal eléctrico de forma reproduzível em resposta a um estímulo físico ou químico. É constituído essencialmente por três componentes: zona de reconhecimento, transdutor e detector. O analito é reconhecido devido à sua interacção com um agente químico ou biológico presente na zona de reconhecimento. Ocorre alteração de uma propriedade físico-química que será convertida num sinal eléctrico pelo transdutor. Este é quantificado pelo detector.

Um bom sensor apresenta uma interacção reversível com o analíto, produzindo respostas reprodutíveis, é selectivo, apresenta robustez mecânica e química, é preferencialmente de baixo ou médio custo e se possível portátil facilitando o seu transporte para amostragens. Tal como será descrito de seguida, a escolha de um sensor acústico traz várias vantagens.

2.3.1 Piezoelectricidade

Os sensores acústicos baseados em cristais piezoelétricos, também conhecidos como microbalanças de cristais piezoelétricos, têm como elemento funcional um material que apresenta piezoelectricidade [59].

Em 1880, Jacques e Pierre Curie descobriram o efeito piezoelétrico, descrevendo-o como a produção de um potencial eléctrico numa superfície deformada por uma compressão (efeito piezoelétrico directo) e a deformação do mesmo cristal quando lhe é aplicada um potencial eléctrico (efeito piezoelétrico indirecto).

2.3.2 Microbalanças de Cristais de Quartzo (MCQ)

O cristal de quartzo α é o mais utilizado devido a ser inerte, estável, insolúvel em água, mantém a piezoelectricidade até 579 °C e tem um elevado factor de qualidade (Q). Este é traduzido pela razão entre a energia armazenada e energia perdida por ciclo, durante a oscilação garantindo estabilidade na frequência [60].

O ângulo de corte do cristal vai influenciar as suas propriedades e aplicações, devido às propriedades anisotrópicas. Para a obtenção de altas frequências o parâmetro que interessa é a espessura.

Os sensores acústicos com cristais de quartzo são dispositivos que funcionam em modo de cisalhamento, ou seja, as ondas acústicas propagam-se perpendicularmente à

superfície do cristal. Para tal, o corte tem que ter uma orientação específica relativamente aos eixos cristalográficos (Figura 4A). O corte AT (Figura 4B) é um dos mais adequados para este tipo de funcionamento [60] e confere um coeficiente de temperatura de 1ppm/°C para temperaturas entre 10 e 50 °C [61].

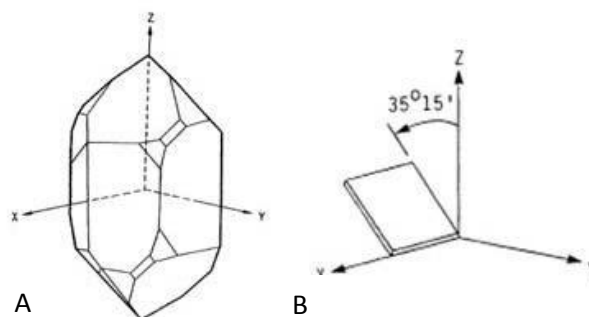


Figura 4: A- Estrutura cristalina do quartzo com eixos atribuídos. B- Orientação do corte AT [61].

Ao ser aplicado um potencial, o cristal de quartzo tem uma frequência de ressonância característica. Ao ser depositada uma determinada massa sobre o cristal, a sua frequência vai diminuir, funcionando como o nome indica como uma microbalança. Para obter uma maior variação da frequência são recomendados cristais com maiores frequências de ressonância. Para um cristal AT, quanto maior a frequência de ressonância menor a espessura, podendo trazer problemas devido à sua fragilidade e menor reprodutibilidade. Para além disso, a elevadas frequências de ressonância, à temperatura ambiente o factor de qualidade do cristal de quartzo tende a ser menor. Um cristal com uma frequência de 9,0 MHz possibilita uma variação de frequência razoável para uma determinada massa e a espessura é aceitável [62].

Algumas das afirmações anteriores podem ser percebidas pela equação de Sauerbrey [1], onde se mostra que a variação da frequência de ressonância do cristal é proporcional à massa depositada. Esta equação é válida para cristais de quartzo AT vibrando em modo de cisalhamento, com um revestimento fino, rígido e uniformemente distribuído.

$$\Delta F = -2,3 \times 10^{-6} F^2 \frac{\Delta M_f}{A} \quad (I)$$

Onde,

ΔF é a variação da frequência devido à massa depositada, Hz;

F é a frequência de ressonância do cristal de quartzo, MHz;

ΔM_f é a massa do filme depositado, g;

A é a área revestida. cm^2 . [63]

Devido às limitações que resultam da sua dedução e ao facto de existirem outros factores que afectam a frequência como a temperatura, o aperto mecânico, entre outros é necessário fazer uma curva de calibração em análise quantitativa. Para além disso, quando o revestimento é com biomoléculas nem sempre a resposta vai ao encontro da prevista pela equação de Sauerbrey. Este facto deve-se às moléculas de água presentes no revestimento, interacções proteína superfície, e viscoelasticidade que afectam a estrutura do revestimento [64].

Aos cristais de quartzo (em forma de um fino disco), são depositados dois eléctrodos de um metal, como por exemplo o ouro, um de cada lado de modo a poder ser induzido um potencial eléctrico oscilante perpendicular à superfície (Figura 5). O cristal é ligado a um oscilador formando assim um circuito eléctrico. Ocorre deformação do cristal havendo propagação de ondas acústicas (efeito piezoeléctrico indirecto). O cristal é que vai determinar a frequência do circuito, tendo uma frequência típica entre 5 e 10 MHz.



Figura 5: Cristal com eléctrodos de ouro.

Geralmente o cristal é inserido numa célula que pode ser adaptada consoante o tipo de amostra (gás, líquido). O cristal é ligado a um oscilador, que por sua vez é ligado a uma fonte de alimentação e um frequencímetro. Esta é a montagem básica para análises com sensores acústicos.

2.3.3 Revestimento

Se o analíto em questão não interagir directamente com os eléctrodos terá de ser adicionado um revestimento apropriado de modo a garantir selectividade ao sensor. Neste caso, é essencial conhecer a estrutura e propriedades do analíto de modo a escolher o revestimento mais adequado, permitindo assim construir um sensor eficaz. O revestimento terá então de ser selectivo, sensível, estável, interagir num curto espaço de tempo e reversivelmente com o analíto. Podem ser aplicados revestimentos constituídos à base de compostos orgânicos, inorgânicos e elementos biologicamente activos.

A estabilidade do revestimento está relacionada com a sua interacção com o eléctrodo do cristal e as condições em que os ensaios são feitos. A interacção entre o revestimento e o analíto não pode envolver formação de ligações covalentes. Este tipo de interacção é que vai determinar a reversibilidade do revestimento, quanto mais fraca é maior a sua reversibilidade e geralmente menor a selectividade.

No presente trabalho o cristal foi revestido com um revestimento que interage com amoníaco e ião amónio. Esta interacção é rápida e reversível, dando origem a um decréscimo na frequência do cristal, obtendo-se uma resposta.

2.3.4 Vantagens e outras aplicações dos sensores acústicos

O sensor acústico, geralmente tem uma resposta rápida, possibilitando a determinação do analíto em tempo real, tem poucos custos associados e pode ser aplicado em vários tipos de sistemas (gasosos; líquidos; arrays, possibilitando análises em simultâneo). Têm uma elevada sensibilidade, segundo a equação de Sauerbrey um cristal de 9 MHz tem uma sensibilidade de 400 Hz/ μg (eléctrodos de 3-8 mm de diâmetro e 0,15mm de espessura) e o limite de detecção é estimado para 10^{-12} g. Os sensores acústicos são reutilizáveis, tem uma simples montagem e os componentes são fáceis de encontrar.

Graças à relação linear entre a variação da frequência e a variação da massa depositada nos eléctrodos do cristal, este tipo de sensores foram aplicados em várias áreas. Existem vários processos bioquímicos, químicos e físicos que podem ser seguidos pela variação da massa associada. Os sensores acústicos podem também ser usados em estudos de propriedades viscoelásticas, transições de fase, adsorção de moléculas e motilidade de células vivas [65] ou na detecção de um composto ou uma família de compostos.

Em 1972, Shons e os seus colaboradores [66] foram os primeiros a usar um revestimento com um elemento biológico, em sensores acústicos. Depositaram antígenos no cristal de modo a detectar os respectivos anticorpos numa solução, criando assim o primeiro biossensor piezoeléctrico. Desde então, foram desenvolvidos vários biossensores aplicando revestimentos com vários elementos biológicos, tais como enzimas, anticorpos e microorganismos. Estes foram aplicados em análises ambientais [67], alimentares [68], e clínicas [60], com objectivo de detectar compostos como herbicidas, pesticidas e toxinas tal como detectar biomoléculas e microrganismos.

2.4 Biossensores e métodos bioanalíticos

O que se propõe no presente trabalho é o desenvolvimento de um biossensor para Amidas, mais especificamente acetamida e acrilamida.

A definição de biossensor segundo a IUPAC é:

“Um dispositivo que utiliza reacções bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelos ou células inteiras para detectar compostos químicos geralmente através de sinais eléctricos, térmicos ou ópticos.” [69]

Geralmente o dispositivo analítico incorpora o biocatalisador na parte de reconhecimento selectivo do analíto. Se não se encontra neste componente está intimamente relacionado com um transdutor físico-químico [70]. Há quem afirme que se pode considerar um

biossensor um dispositivo que analise amostras biológicas, mesmo não contendo nenhum biocatalisador na sua constituição [71]. Esta é uma definição demasiado abrangente. Tendo em consideração as várias definições, pode-se concluir que num biossensor há um elemento biológico integrante no dispositivo que ao interagir com um determinado composto vai proporcionar uma alteração físico-química sentida pelo transdutor e quantificada pelo detector. Neste trabalho, vamos definir por biossensor, um dispositivo com uma camada de reconhecimento biológica, e designaremos de método/sistema bioanalítico por qualquer método/sistema de análise que incorpore um biocatalisador, independentemente do mesmo integrar também um qualquer tipo de sensor químico.

2.4.1 Sistemas de Injecção em Fluxo

Neste tipo de sistemas, há um fluxo onde podem ser injectados pequenos volumes de amostras que irão sofrer uma transformação química/física tornando-as detectáveis aquando da sua passagem pelo detector. Vários detectores podem ser aplicados em FIA, sendo os dominantes os ópticos e electroquímicos. Para ser aplicado um sensor neste sistema, este terá de ter uma resposta rápida de modo a acompanhar a passagem do fluxo.

Se se incorporar um biorreactor no sistema, terá que ocorrer uma interacção rápida entre o biocatalisador e o substrato geralmente num tampão, havendo catálise on-line. O controlo do caudal de arraste é fundamental para garantir uma adequada interacção com o biocatalisador. A velocidade do fluxo terá de ser suficientemente lenta para proporcionar o tempo necessário para a catálise ocorrer, embora, quanto mais lento for o caudal, maior será a dispersão do produto da reacção [72].

Foram desenvolvidos vários estudos em que se implementavam biorreactores em sistemas FIA, tendo como objectivo a análise de compostos presentes em diferentes tipos de amostras, podendo haver detecção simultânea de compostos [73].

Uma das maiores vantagens desta técnica é a sua versatilidade, conseguida devido à adição de componentes no sistema e a possibilidade de implementar diferentes detectores. O seu uso vai para além da investigação em sensores, sendo aplicado no controlo de processos na área industrial e análise ambiental. Possibilita análises específicas no campo, de modo contínuo e automatizado. Actualmente existem alguns destes sistemas no mercado para monitorização de carência bioquímica de oxigénio (CBO) tendo na sua constituição biocatalisadores [72].

No ponto 3.3.2 está esquematizada uma montagem com a instrumentação básica de um sistema de injeção em fluxo.

2.4.2 Componente biológica

As enzimas são moléculas cataliticamente activas com elevada importância nos organismos vivos. Catalisam reacções que na sua ausência dificilmente aconteceriam. Ao ser aplicadas em técnicas de análise permitem obter uma elevada selectividade e sensibilidade.

Pretende-se que o componente biológico para este biossensor/sistema bioanalítico contenha uma enzima que interaja com as amidas. A *Pseudomonas aeruginosa* L10 produz a enzima amidase (acilamida amido hidrolase EC 3.5.1.4), tal como a sua classificação indica, é uma enzima que cataliza ligações -C-N (não peptídicas) na presença de água, ou seja, é responsável pela hidrólise de amidas. Para além de ser uma hidrolase, a amidase também é uma transferase, ou seja, cataliza a transferência de grupos acilo de amidas para hidroxilamina. A enzima original (wild type) tem especificidade para amidas alifáticas de cadeia curta como a acetamida, acrilamida, fenilacetamida e p-nitrofenilacetamida [74]. A expressão desta enzima é induzida pela presença destas amidas. A característica da enzima recombinante é ser produzida na ausência das amidas, isto é, a sua expressão é independente da presença de indutores como a amida [75]. Na Figura 6 pode-se observar várias representações da amidase. Esta enzima converte a

amida em amoníaco e o respectivo ácido carboxílico como está representada a reacção na Figura 7. Dependendo do pH ocorre conversão do amoníaco no ião amónio e do ácido acético a acetato.

Apesar da maior selectividade e melhores resultados obtidos no caso de se imobilizarem apenas a enzima pura, o processo encarece devido à necessidade de extrair, isolar e purificar as mesmas. Recorrendo às células inteiras, as enzimas estão no seu ambiente natural, dispensando a adição de cofactores e possibilitando reacções consecutivas. Neste caso, os custos são bastante reduzidos, há menos susceptibilidade para inibição e maior tolerância a alterações de pH e temperatura. Geralmente a durabilidade é maior e pode ser feita imobilização por adsorção física menos agressiva [73,76]. No entanto, dependendo do que se pretende, o uso de células inteiras pode trazer problemas como a ocorrência de reacções indesejadas, e impedimentos na difusão dos substratos e produtos pelas membranas/paredes celulares [77]. Um compromisso razoável entre estas duas hipóteses é o uso de extracto celular parcialmente purificado com adição de compostos que inibem as outras enzimas. No presente trabalho, essa inibição foi conseguida com a adição de benzamidina, inibidora de protéases.

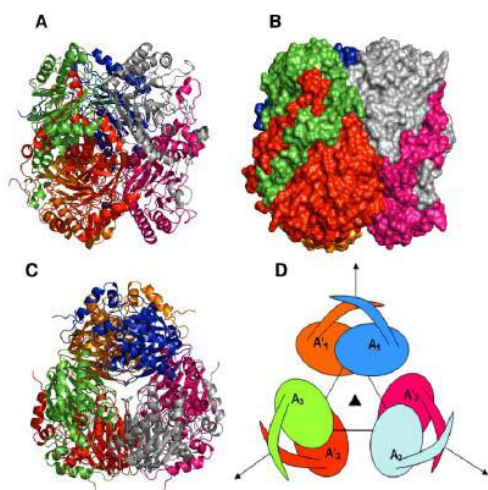


Figura 6: Representação do homo-hexámero da Amidase, A e C- estrutura da Amidase vista de dois ângulos diferentes, B- representação da superfície do hexámero em contacto com o solvente, D- representação esquemática do hexámero, realçando o empacotamento dos monómeros [78].

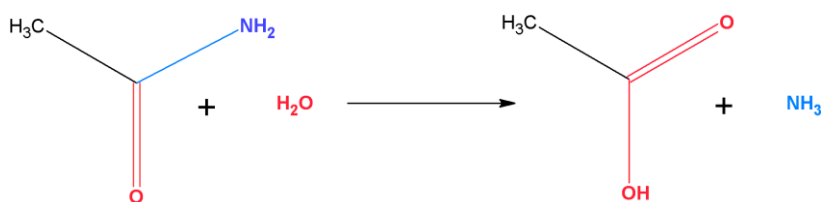


Figura 7: Reacção entre a acetamida e a amidase, dando origem ao ácido acético e amoníaco [74].

Aplicou-se a componente biológica inicialmente como revestimento no cristal e depois imobilizou-se num biorreactor inserido num sistema de FIA.

2.5 Imobilização de biocatalisadores

2.5.1 Vantagens de imobilizar biocatalisadores

No desenvolvimento de um biossensor em que a camada de reconhecimento é constituída por exemplo por enzimas ou células inteiras, um ponto crítico poderá ser a imobilização das mesmas. A imobilização é também necessária no caso do desenvolvimento de um biorreactor. O objectivo é confinar o biocatalisador e torná-lo estável ao longo do tempo, isto é, criar um microambiente para garantir protecção à erosão e manter a actividade biológica ao longo dos ensaios. Por isso, é essencial perceber o mecanismo de imobilização.

Imobilizando biocatalisadores torna-se possível poder reutilizá-los e facilitar a sua separação dos produtos. É também importante a estabilidade que se consegue ao longo do tempo, muito devido à maior protecção contra várias formas de desnaturação (pH, temperatura). A possibilidade de poder ter uma maior concentração de enzima leva à formação de uma maior quantidade apreciável de produto em menos tempo [76, 79]. No entanto, se o processo não for adequadamente, realizado e optimizado, poderão surgir alguns problemas. Pode haver acumulação de produtos que podem ser tóxicos e levar à inibição das enzimas, com o processo imobilização podem aparecer restrições estereoquímicas impedindo o acesso ao centro activo; pode haver perda da enzima, entre

outros problemas associados com a preservação da matriz como por exemplo a degradação do gel de alginato de cálcio [76]. Alguns reagentes usados no processo de imobilização são tóxicos, por isso deve usar-se a menor quantidade possível, e diminuir o tempo de contacto. É difícil evitar este tipo de problemas, por isso é que cada caso tem de ser visto individualmente e de modo pormenorizado.

2.5.2 Tipos de imobilização

Há vários tipos de classificações para os variadíssimos métodos de imobilização existentes. Tendo em conta a forma obtida após a imobilização do biocatalisador, pode-se separar em dois grandes grupos: insolúveis e solúveis, como estão exemplificados na Figura 8.

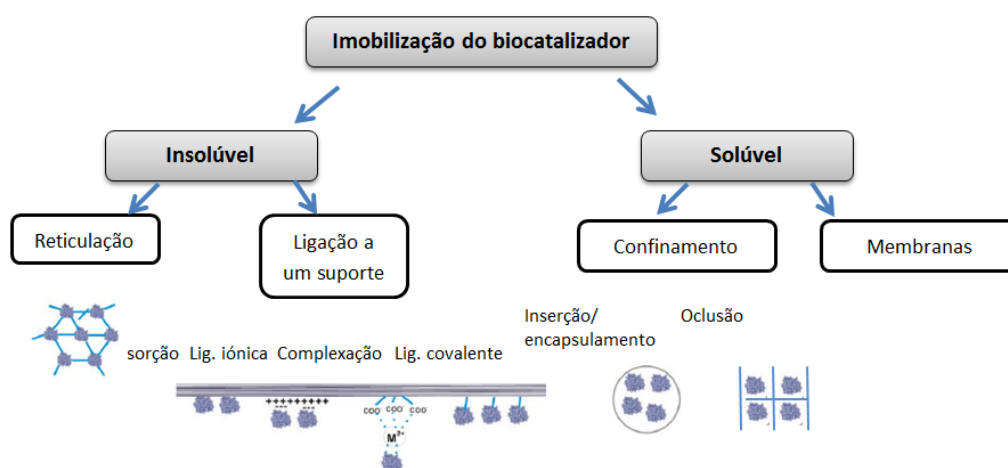


Figura 8: Métodos de imobilização de biocatalisadores. [Adaptado de [76, 80]]

Considera-se que um biocatalisador foi imobilizado na forma insolúvel quando se formam **ligações à superfície de um suporte ou se se deu a reticulação do mesmo** (Crosslinking). As ligações podem ser iónicas, covalentes, ocorrer adsorção física ou complexação na presença de um catião metálico. O suporte pode ser de origem orgânica, inorgânica, natural ou sintética e morfologicamente poroso e não poroso [76].

Na escolha do suporte num método de imobilização, devem ser considerados vários aspectos que estão descritos na Figura 9. Consoante o tipo de sistema em que o biocatalisador está inserido o suporte poderá ter várias geometrias podendo ser esférico,

fibroso ou na forma de membranas. A estabilidade do suporte a alterações do meio reaccional (pH, força iónica, solventes orgânicos) tal como o seu comportamento a valores de temperatura elevados é essencial para garantir um maior tempo de vida do biocatalisador imobilizado. Para além disso, a possibilidade de regeneração do suporte é essencial para a reutilização do sistema/sensor em que o biocatalisador está inserido. A definição do carácter hidrófobo/hidrofílico do suporte permite excluir a adesão/aproximação certos compostos que não o substrato. A existência de grupos funcionais reactivos vai depender do tipo de suporte escolhido, geralmente os de origem orgânica têm estes grupos, enquanto os de origem inorgânica não. Na ausência destes grupos, são aplicadas técnicas de activação/funcionalização adequadas para cada tipo de superfície [76].

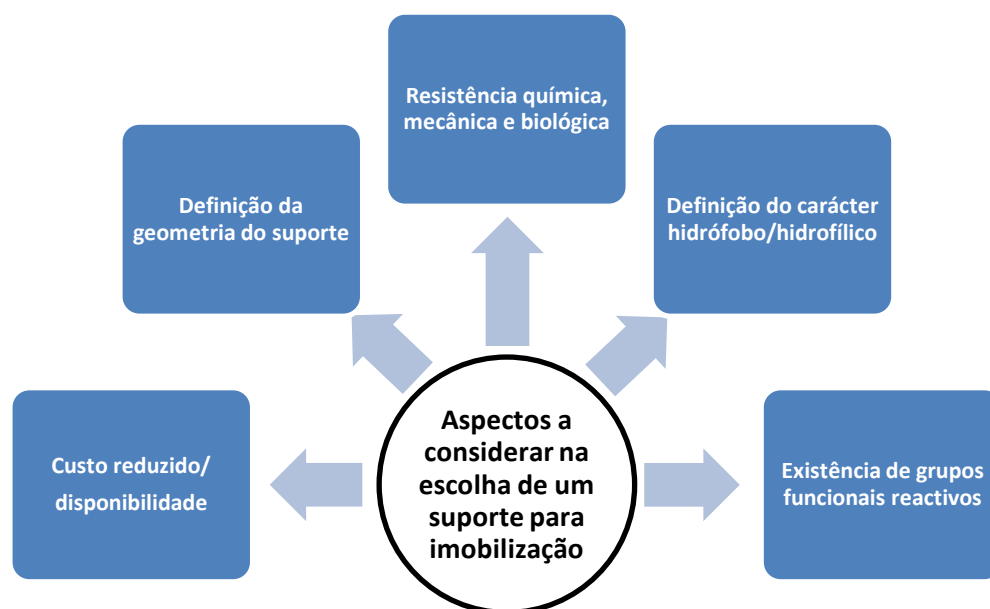


Figura 9: Aspectos a considerar na escolha de um suporte para imobilização [adaptado de [76]].

O segundo grupo da figura 8 correspondente a biocatalisadores solúveis na matriz, é imobilizado por **confinamento do biocatalisador numa matriz**, podendo esta ser de natureza sintética (ex. resinas, nylon e silicone), derivada de proteínas (ex.gelatina e albumina) ou polissacarídeos (ex. alginatos, pectinas e celulose). O confinamento pode ser feito por formação de polímeros, precipitação, trocas iónicas que despoitem formação de géis. O biocatalisador pode ser inserido ou encapsulado numa matriz pré-

formada ou incorporado numa rede, processo denominado de oclusão. Para além destes tipos de confinamento, é possível ainda reter o biocatalisador através de membranas, permeáveis aos analitos [76].

De seguida serão abordados mais especificamente os métodos de imobilização usados neste trabalho.

2.5.2.1 Reticulação com agentes bifuncionais

Neste método de imobilização há formação de ligações cruzadas (covalentes) entre o biocatalisador e um agente bi- ou multifuncional, dando origem a agregados insolúveis em água. Apesar destes reagentes serem tóxicos para as biomoléculas, a sua aplicação pode ser encontrada em diversos estudos, aparecendo com maior frequência o GA, que é usado na imobilização de anticorpos [81], proteínas [82] ou enzimas [83]. O GA reage com os grupos amina, tiol, fenol e imidazol das proteínas, formando uma base de Schiff. Na Figura 10 apresenta-se um esquema da reacção. O GA interage com as proteínas na presença de um tampão em condições de pH, temperatura e força iónica fisiológicas.

Para além da formação dum reticulado, o GA permite ligar as enzimas a um suporte insolúvel, como sílica, ou a outras proteínas reticuladas como a gelatina e o BSA. Não existe um protocolo para este tipo de imobilização, tendo cada caso de ser analisado isoladamente, de modo, a garantir a melhor imobilização de acordo com as condições presentes (pH, temperatura, concentração dos reagentes). Sabe-se que o teor de lisina nas enzimas favorece a reticulação com GA. Na presença de enzimas com um baixo teor deste aminoácido devem-se adicionar proteínas estáveis e ricas no aminoácido em falta (ex: BSA). Este método tem como vantagem a fácil execução e a utilização de apenas um reagente [76, 84].

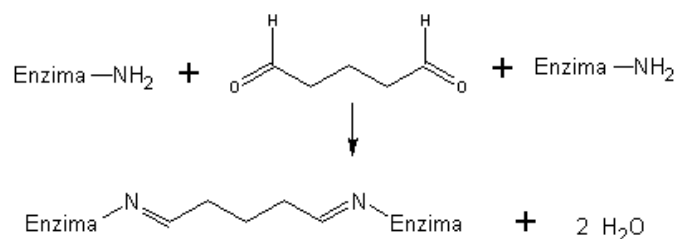


Figura 10: Reacção química de uma enzima e GA.

2.5.2.2 Ligação a um suporte – por ligação covalente

É abordado apenas este tipo de ligação, pois foi o que se usou no trabalho experimental.

Neste tipo de imobilização forma-se uma ligação entre um grupo reactivo do suporte e um grupo reactivo das cadeias laterais dos aminoácidos presentes no biocatalisador. Esta ligação é geralmente feita entre grupos amina, carboxilo, hidroxilo, tiol e fenol. Após a ligação, deve manter-se a conformação nativa do biocatalisador (excluindo quando é um microorganismo), de modo a não interferir com a actividade catalítica do mesmo.

Tal como já foi discutido, nem todos os suportes têm grupos reactivos onde se possam ligar os biocatalisadores. Os suportes inorgânicos têm a vantagem de ser inertes, no entanto, a formação de uma ligação covalente a um biocatalisador só é possível recorrendo a métodos de funcionalização como é o caso da silanização. Discutem-se alguns destes métodos de seguida.

A silanização é a modificação ou funcionalização de uma superfície através da ligação de moléculas organofuncionais contendo sílica. Este processo permite a protecção das superfícies contra oxidação, degradação na presença de determinados agentes químicos, evita uma possível agregação entre superfícies e permite conferir uma modificação química da superfície para posterior funcionalização. No caso deste último, ocorre adição de um grupo funcional com maior reactividade á superfície de um suporte, favorecendo a imobilização de biocatalisadores. Este grupo reactivo pode ser de várias naturezas, os mais comuns são grupos amina, carboxílico, tiol, que podem estar inseridos em a tetra-

alcoxissilanos. A ligação do biocatalisador pode ser feita directamente com o silano ou apenas na presença de um agente intermediário (linker) [76]. A Figura 11 ilustra os vários passos de uma funcionalização.

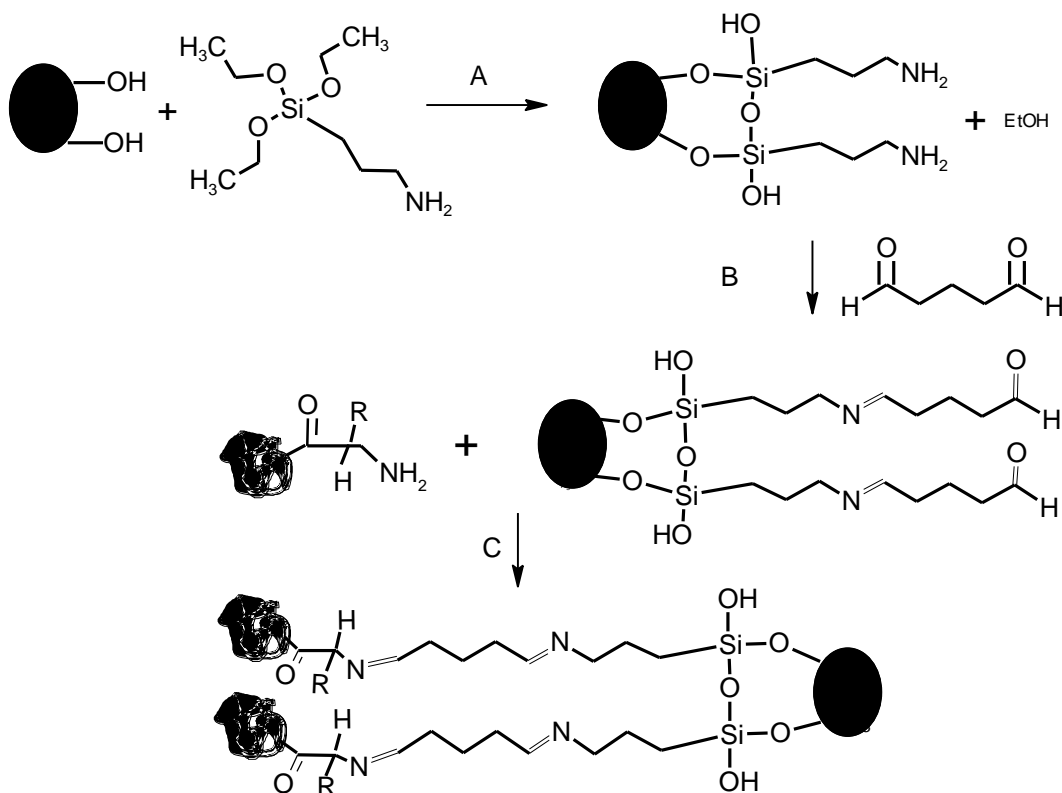


Figura 11: Funcionalização de uma superfície de vidro: A- silanização (adição de APTS), B- adição de GA, C- adição de uma proteína.

Método de sol-gel

Neste método há a transição de determinados compostos num sistema "sol", sendo este uma dispersão de partículas coloidais, para um sistema "gel" onde há a formação de uma matriz polimérica [85].

Fazendo uso de alcoxissilanos como precursores inorgânicos, o método permite uma grande versatilidade dada a variedade de grupos funcionais associados a estes compostos.

A hidrólise de tetra-alcoxissilanos em solventes orgânicos, como etanol, dá origem a partículas com grupos silanol livres que serão condensadas, havendo conversão da fase sol para gel. Estas reacções estão ilustradas na Figura 12, no entanto, o mecanismo da condensação não está ainda bem definido na literatura. A condensação pode ocorrer entre grupos silanol ou entre estes e um alcóxido.

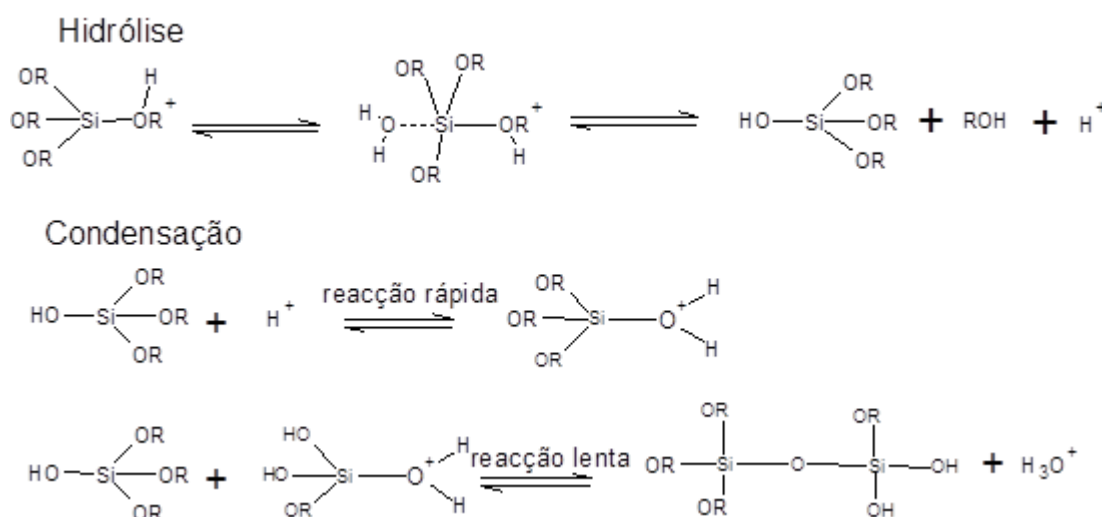


Figura 12: Reacção de hidrólise e condensação de alcoxissilanos por catálise ácida. [Adaptado de [86]]

Após a formação do produto final a ligação à superfície do vidro ocorre como está representado na reacção A da Figura 11. Há vários mecanismos propostos para esta reacção, sendo um deles o ataque do grupo hidroxilo do silanol ao grupo alcóxido do silano formando-se uma ligação covalente.

Os alcóxissilanos possuem uma baixa reactividade, por isso é muitas vezes adicionado um catalisador para acelerar o processo, podendo este ser um ácido ou uma base. De acordo com o catalisador usado, a catálise altera-se [86]. A natureza do catalisador tal como a do alcoxissilano e a proporção água:silano vão determinar a cinética das reacções e as propriedades do produto final.

A silanização pelo método de sol-gel permite combinar materiais orgânicos e inorgânicos, originando materiais híbridos a baixas temperaturas.

Silanização em meio orgânico

Na silanização feita em meio orgânico o alcoxissilano é dissolvido num solvente orgânico como o tolueno. Com este tipo de silanização obtém-se uma camada mais grossa, irregular e menos fortemente ligada.

A silanização é um processo onde nem sempre se consegue reprodutibilidade e eficiência. Na silanização feita com APTS para posterior imobilização de um biocatalisador, mesmo que o processo tenha sido eficiente é necessário que haja um determinado número de grupos amino disponíveis. Isto, para garantir a quantidade suficiente de biocatalisador imobilizado e consequentemente uma conversão que irá dar origem a uma determinada resposta. Neste caso específico, pode acontecer que nem todos os grupos amino do APTS fiquem disponíveis para o passo seguinte, pois reagem com grupos silanol que ficaram livres. Segundo Kamisetty *et al.* [87] uma silanização adicional com silanos mais pequenos, também denominada de “capping” pode evitar este fenómeno inactivando os grupos silanol livres como é possível observar na Figura 13.

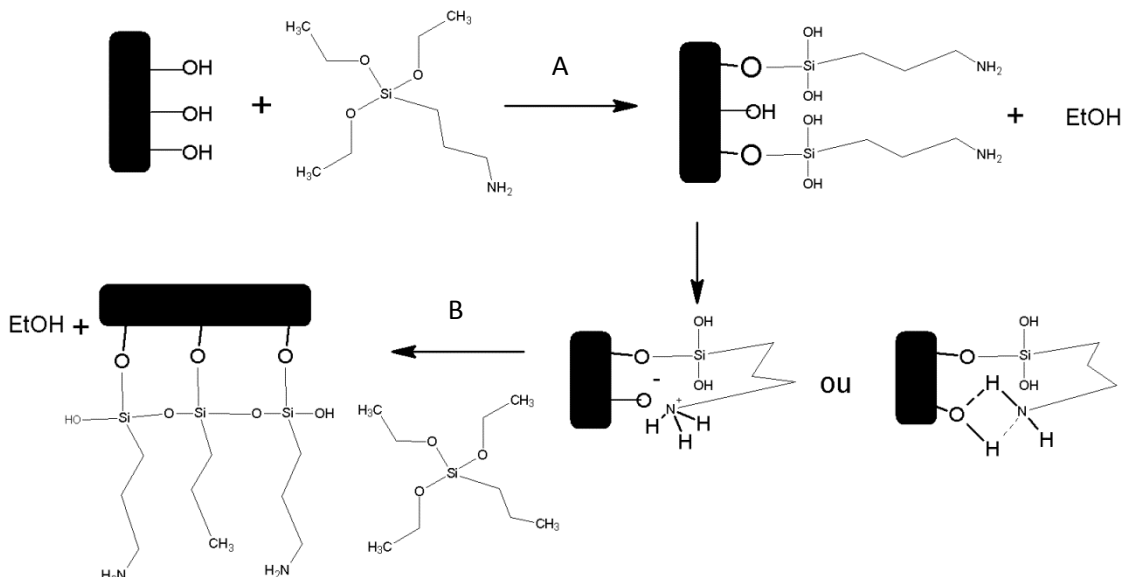


Figura 13: Esquema do processo de silanização de uma superfície de vidro. A- primeira silanização com APTS, B- segunda silanização (capping) [adaptado de [87]].

2.5.2.3 Confinamento- oclusão em alginato de cálcio

Neste tipo de imobilização o biocatalizador é inserido numa matriz porosa não estabelecendo uma ligação química com a mesma. Forma-se um gel insolúvel na água com o biocatalisador activo no seu interior. Para que a imobilização seja eficaz, a porosidade da matriz tem que permitir que haja difusão de moléculas entre o meio envolvente e o interior do suporte. A porosidade também está directamente associada com a robustez mecânica. A robustez aumenta com o aumento das ligações da malha tridimensional, diminuindo o tamanho dos poros. Tem que se assumir um compromisso entre a porosidade e a robustez de modo a não impedir a difusão de moléculas. As maiores limitações associadas a este método prendem-se com a falta de robustez mecânica, com a durabilidade do gel e quando aplicado a biossensores pode levar ao aumento dos tempos de resposta, devido à difusão molecular [76].

Este tipo de imobilização é mais usado com células inteiras, devido à sua fraca capacidade de retenção de enzimas. É considerado um método rápido, com reagentes baratos e que não apresentam nenhum perigo no seu manuseamento.

Na oclusão de um biocatalisador em alginato de cálcio ocorre a conversão de uma matriz polimérica (alginato de sódio), num gel com a adição de um contra ião multivalente, o cálcio.

3. Materiais e métodos

3.1 Reagentes e Aparelhagem

Nas tabelas 4 e 5 estão listados todos os reagentes e instrumentos usados ao longo do trabalho experimental. Todos os reagentes foram usados sem qualquer purificação adicional, à excepção do tolueno que foi seco com um fio de sódio. Os cristais piezoelétricos usados neste trabalho são de quartzo α , corte AT HC-6/U, 9 MHz de frequência de ressonância, polidos e com eléctrodos de ouro.

O analíto em estudo foi acetamida, uma vez que esta é menos tóxica que a acrilamida. Após se desenvolver o método para a acetamida pode ser facilmente adaptado para acrilamida.

Tabela 4: Reagentes usados.

Reagente	Marca
3-aminopropiltrietoxissilano (APTS)	Acros Organics 430941000
Acetamida	Merck 822343
Acetona	Riedel de Haën 32201
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	Merck 8418
Ácido nítrico	Merck 452
Água MiliQ	Millipore Plus 185
Albumina de soro bovino (BSA)	Merck 12657
Alginato de sódio	Sigma Aldrich W20150
β-mercaptoetanol	Fluka 63690
Benzamidina	Merck 820122
Cloreto de cálcio	LALSOLVE 50075
Clorofórmio	AnalaR Normapur 09860
Etanol pa e absoluto	Panreac 121086.1212
Gás de arraste dos sistemas - Azoto	Alphagaz da ArLíquido
Gelatina	Merck 1.04078
Glutaraldeído 25%	Sigma Aldrich G625
Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazina] Etanesulfónico (HEPES) 99%	Acros Organics 172570250
Hidrogenodifluoreto de amónio	Fluka 09835
Hidróxido de amónio	Fluka 09860
Hidróxido de potássio	Sigma Aldrich P1767
Tolueno pa	Riedel de Haën 32249

Tabela 5: Aparelhagem usada.

Instrumentos	Marca
Spin Coater DELTA 10TT	SÜSS MicroTec
Frequencímetro	Leader LF 827
Oscilador	Montado no laboratório
Manómetro	OMNIFIT 3101
Rotâmetro	Cole Parmer
Válvula de injeção/porta de injeção	OMNIFIT 3301

3.2 Síntese e preparação do revestimento biológico.

Aplicação do revestimento biológico e químico

3.2.1 Método de aplicação do revestimento químico

Antes da aplicação do revestimento, os cristais foram lavados com clorofórmio e acetona destilada de modo a retirar toda a sujidade que poderia interferir nas análises. Depois de seco, a frequência foi lida.

O revestimento foi aplicado apenas numa das faces do cristal, sendo esta a que iria ficar mais tarde em contacto com o líquido. O revestimento foi aplicado recorrendo à técnica de *Spin Coating*. A técnica utiliza um Spin Coater, que está representado na Figura 14A, este fixa o cristal por vácuo e o faz rodar a uma velocidade que pode ser seleccionada.

Utilizou-se clorofórmio para dissolver o revestimento inicialmente em pó. O cristal foi inserido na respectiva caixa onde foi feita uma abertura no centro (Figura 14B). Através da abertura, foi aplicada uma porção de revestimento com uma micropiteta. Accionou-se o vácuo e seleccionam-se a velocidade de rotação e o tempo. A solução do revestimento distribuiu-se pelo cristal. Os parâmetros utilizados podem variar consoante a consistência

do revestimento e a velocidade do Spin Coater vai depender do factor de diluição utilizado. Quanto mais diluído, menor a velocidade de rotação, evitando que uma quantidade significativa de composto se deposite fora do eléctrodo, onde não tem utilidade. De modo a evitar este desperdício, o intervalo de velocidades usadas para revestir os cristais encontram-se entre 150 a 200 RPM e foram aplicadas durante 30 segundos. Para atingir a quantidade de revestimento pretendida, isto é, um decréscimo na frequência de 18-20 KHz a aplicação do revestimento foi feita pela adição sucessiva de 2 μ L do composto dissolvido em clorofórmio. Posto isto, esperaram-se 48 horas para garantir uma secagem eficiente do revestimento. A frequência do cristal foi novamente lida e a quantidade do revestimento pode ser estimada pela diferença entre esta frequência e a inicial.

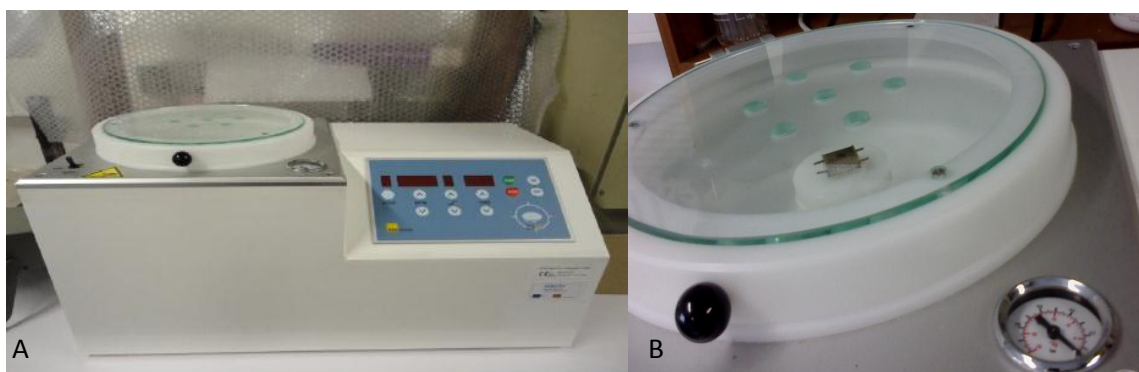


Figura 14: Spin Coater

3.2.2 Preparação e aplicação do revestimento biológico

O revestimento biológico foi aplicado sobre o revestimento químico. O revestimento biológico consiste num biocatalisador imobilizado, podendo ser este células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10 ou o respectivo extracto celular que foram cedidos pelo Professor Amin Karmali do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Tanto as células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10 como o respectivo extracto celular foram armazenados no congelador a -20°C em tampão TMEGB [Tris-HCl 50 mM (pH 7.2) contendo β -mercaptoetanol 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), e benzamidina 1 mM].

Para a *imobilização de células inteiras* foi necessário *preparar a suspensão celular* e depois *preparar o revestimento biológico*. Primeiramente, descongelou-se um eppendorf com células inteiras, centrifugou-se a 11 500 RPM durante 3 a 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet com o tampão HEPES 0,01M (pH 7,1) com EDTA 1 mM e β -mercaptoetanol 2 mM, começando por se adicionar 100 μ L até obter uma consistência homogénea. Para a *preparação do revestimento biológico*, imobilizou-se o biocatalisador por reticulação com um agente bifuncional. Mediram-se 60 μ L da suspensão celular e colocaram-se num eppendorf juntamente com 2,5 mg de BSA e 4 μ L de GA 5% (v/v). Agitou-se a mistura no vórtex e adicionou-se uma gota sobre o cristal imediatamente após a sua preparação. Esperou-se 30 minutos para secar o revestimento e lavou-se duas a três vezes com tampão HEPES de modo a retirar resíduos do revestimento não ligados.

Usou-se também como biocatalisador o extracto celular de *Pseudomonas aeruginosa* L10. Após se descongelar um eppendorf de extracto celular, retiraram-se 20 μ L e juntaram-se 4 μ L de uma solução de BSA 15% (m/v) e 1 μ L de GA 5% (v/v). Após a agitação no vórtex o revestimento foi aplicado como referido anteriormente.

A frequência do cristal foi lida antes de se aplicar o revestimento e após a sua secagem.

O tampão usado nas análises e armazenamento do biossensor foi HEPES 0,01M (pH 7,1) com EDTA 1 mM e β -mercaptoetanol 2mM. O β -mercaptoetanol evita que haja formação de ligações dissulfureto entre as cisteínas presentes no centro activo da amidase [88]. Deste modo mantém a conformação da enzima garantindo a sua actividade catalítica. O EDTA protege a enzima de metais pesados que inibem a sua actividade.

3.3 Montagem experimental e metodologias analíticas

3.3.1 Sistema utilizando um biossensor com dupla camada: química e biológica

Após a adição dos dois revestimentos químico e biológico (células inteiras ou extracto celular) espera-se uma distribuição no cristal como é representada na Figura 15A. Este cristal vai integrar um sistema adaptado para análise em líquidos sem fluxo (Figura 15B).

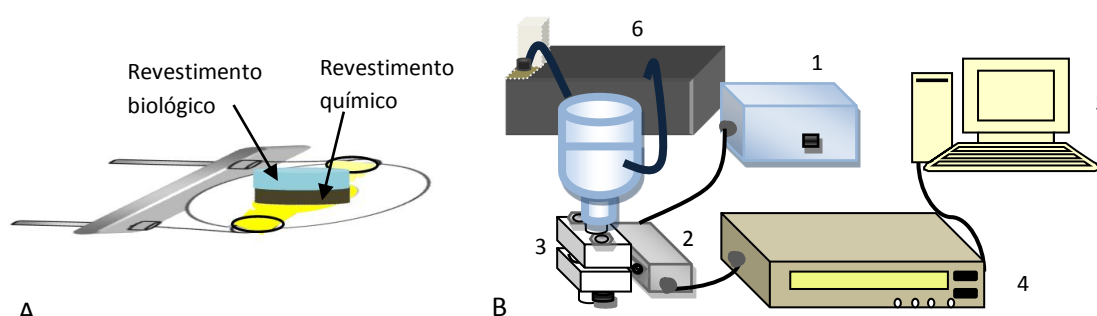


Figura 15: A - Representação do cristal com duplo revestimento,
B - Esquema da montagem 1- Fonte de Alimentação, 2- Oscilador, 3- Célula do cristal ligada a um reservatório termostaticado para a amostra, 4 - Frequencímetro, 5- Computador para aquisição de dados, 6- Banho termostaticado.

O cristal foi colocado entre as duas peças de uma célula de teflon sendo ajustado com dois o-rings em cada uma das faces de modo a vedar a passagem do líquido e suavizar o contacto com a célula que é rígida. A esta célula foi acoplado um reservatório termostaticado (25 °C). Ligou-se o cristal no oscilador, fazendo assim parte de um circuito eléctrico, ligado a uma fonte de alimentação com uma voltagem de 9 Volts. Usou-se um frequencímetro que detecta variações mínimas de 1Hz por segundo. Este encontra-se por sua vez ligado a um computador com um software de aquisição (LabView) que permite uma melhor visualização das respostas e guardar os dados.

Para se proceder às análises começou-se por se adicionar 20 ml de tampão HEPES 0,01M (pH 7,1) com EDTA 1 mM e β -mercaptoetanol 2 mM no reservatório termostatzado. Mediu-se a frequência após esta ter estabilizado e foram-se adicionando sucessivamente vários volumes (150 a 300 μ L) de uma solução de 1000 ppm de Acetamida com micropipetas adequadas. Após cada adição verificou-se uma descida da frequência até esta estabilizar. Mediu-se esta frequência e subtraiu-se à medida anteriormente, obtendo-se assim a resposta do cristal à quantidade de Acetamida adicionada. Com este procedimento pretendeu-se construir uma recta de calibração de modo a poder aplicá-la na análise de amostras.

3.3.2 Sistema para análises em Injecção em Fluxo

Neste sistema estão incluídos duas componentes cruciais para a concretização do biossensor para amidas. A componente biológica apresenta-se sob a forma de um biorreactor que está inserido no sistema de FIA. Nele está imobilizado um biocatalisador que irá converter acetamida em iões amónio. Após passar pelo biorreactor o fluxo passa pela célula com um cristal revestido. Neste, há a detecção do amónio formado.

Neste tipo de análises o fluxo pode ser originado com uma bomba peristáltica ou em alternativa como está representado na Figura 17. É aplicada uma corrente de azoto a uma garrafa pressurizada, fazendo sair o seu conteúdo a uma velocidade constante. Neste trabalho o caudal pretendido foi de 0,5 ml/min, para se atingir e manter esta velocidade foi adicionado um rotâmetro para além do manómetro. As injecções dos padrões foram feitas numa porta de injecção associada a uma válvula e um loop de 0,5 ml, sendo esta quantidade injectada no sistema. O fluxo passa pelo biorreactor e de seguida pela célula do cristal.

Esta tem uma geometria adequada ao tipo de sistema como é possível observar pela Figura 16, a face do cristal está em contacto com o líquido através de uma câmara, o que permite um contacto maior com o fluxo e evita formação de bolhas de ar. A sequência

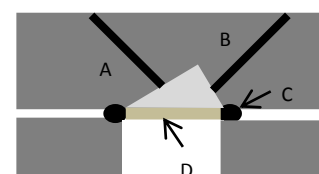


Figura 16: Célula do cristal,
A- entrada do fluxo,
B- saída do fluxo,
C- o-rings,
D- cristal de quartzo

final do sistema é igual à montagem anterior, ligou-se o cristal a um oscilador de 9 MHz que por sua vez estava ligado a uma fonte de alimentação e a um frequencímetro. Foi também feita aquisição de dados. Todo o sistema foi conectado com tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro.

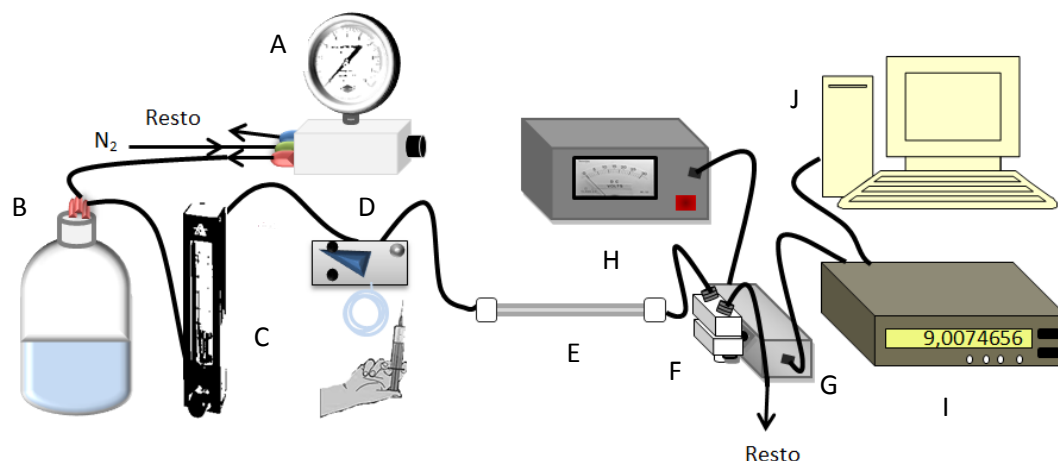


Figura 17: Montagem do sistema de Análise em injeção em fluxo. A- Manómetro , B- Garrafa pressurizada com tampão, C- Rotâmetro, D – Válvula e porta de injeção com loop da amostra, E- Biorreactor, F- Célula do cristal em PVC, G- Oscilador, H- Fonte de Alimentação, I- Frequencímetro, J- Computador

Usou-se tampão HEPES 5mM (pH 7,1) como líquido em fluxo. As injeções foram feitas apenas quando a frequência estava estável. Após cada injeção houve um decréscimo da frequência atingindo-se um mínimo e de seguida uma recuperação para a frequência inicial. Esta variação de frequência foi sempre anotada, e ao ser correlacionada com a concentração de acetamida injectada dá origem a uma curva de calibração. A partir desta foi possível obter uma recta de calibração. Injectaram-se soluções padrão de acetamida com concentrações compreendidas entre 4 e 580 ppm.

3.3.3 Preparação do biorreactor

3.3.3.1 Preparação do biorreactor 1.0 : Confinamento do biocatalisador em contas de alginato de cálcio

A primeira hipótese para o biorreactor foi confinar o extracto celular em contas de alginato de cálcio.

Após uma série de optimizações chegou-se a um procedimento adequado para a imobilização de extracto celular em contas de alginato de cálcio. Dissolveram-se 128 mg de alginato de sódio em 5 ml de água ultrapura sob agitação e adicionaram-se 7 mg de extracto celular liofilizado ou 154 μL de extracto celular descongelado. Prepararam-se 25 ml de uma solução de CaCl_2 2 % (m/v) que se adicionou gota a gota à mistura anterior. Após deixar sob agitação durante 20 minutos, lavaram-se as contas com uma solução de CaCl_2 0,5 % (m/v) e de seguida com tampão HEPES 5mM (pH 7,1).

Para montar o biorreactor as contas foram acondicionadas num tubo de plástico (20 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro interno)

intercaladas com esferas de vidro de 0,5 cm como se verifica no esquema da Figura 18.



Figura 18: Esquema da estrutura do biorreactor, A- conta de alginato de cálcio, B – esfera de vidro.

Na Figura 19 mostra-se uma fotografia do biorreactor inserido no sistema. O armazenamento do biorreactor ou das contas foi a 4 °C em tampão HEPES 5mM (pH 7,1). No início de cada dia de trabalho passou-se inicialmente pelo tubo durante uns minutos a solução de CaCl_2 0,5 % (m/v).

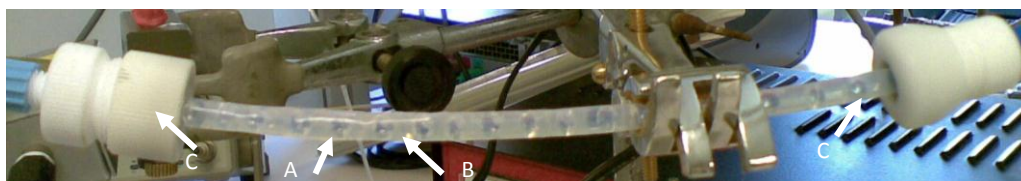


Figura 19: Biorreactor 1.0 inserido no sistema, A - conta de alginato de cálcio com extracto celular, B- esfera de vidro, C- lâ de vidro nas extremidades do tubo.

3.3.3.2 Preparação do biorreactor 2.0: funcionalização de esferas de vidro

Para obter o tipo de funcionalização pretendido, foi necessário cumprir várias etapas: limpeza e activação da superfície do vidro, silanização com um agente funcional e imobilização do biocatalisador (extracto celular ou células inteiras). Funcionalizaram-se esferas de vidro de 0,5 cm de diâmetro.

Silanização em meio orgânico

Primeiramente procedeu-se à *limpeza e activação da superfície do vidro*, este procedimento foi adaptado da referência [88]. Preparou-se uma solução de hidróxido de potássio 5 % (m/v) em etanol e lavaram-se as esferas de vidro. De seguida encheu-se um copo com as esferas e a mesma solução e deixou-se 5 minutos em contacto sob agitação. Repetiu-se o mesmo procedimento com uma solução concentrada de hidrogenodifluoreto de amónio em metanol. Por fim, lavaram-se as esferas com metanol e colocaram-se numa estufa a 120 °C durante 5 horas.

O método de silanização foi adaptado de um estudo desenvolvido por Kamisetty et. al [87] onde a reacção de silanização dá-se com um solvente orgânico. Colocaram-se as esferas num copo com uma solução de APTS 10% (v/v) em tolueno seco e deixou-se permanecer em contacto sob agitação durante 3 horas à temperatura ambiente. Lavaram-se as esferas com tolueno, tolueno:metanol (1:1) e metanol e secou-se na estufa a 120 °C durante 3h. Repetiu-se o mesmo procedimento com uma solução de etiltrimetoxissilano 10 % (v/v) em tolueno seco.

A funcionalização das esferas encerra com a imobilização do biocatalisador. Para isso, puseram-se as esferas em contacto com uma solução de GA 2 % (v/v) em tampão HEPES 5 mM (pH 7,15) e deixou-se sob agitação durante 3 horas à temperatura ambiente. Após lavar as esferas com o tampão, adicionou-se uma solução de 1 mg/ml de extracto celular em tampão. Deixou-se ficar em contacto durante 24 horas a 4 ° C, renovando-se a solução 5 vezes.

Após a funcionalização, as esferas de 0,5 cm de diâmetro, foram empacotadas num tubo de plástico de 20 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro interno. O seu armazenamento em tampão HEPES 5 mM (7,15) com EDTA 1 mM e β -mercaptoetanol 2 mM a 4 ° C.

3.3.3.3 Preparação do biorreactor 3.0: Funcionalização das paredes de um capilar

De modo a obter melhores resultados, foi feita uma alteração na geometria do biorreactor. O objectivo era inserir no sistema um capilar de vidro com um diâmetro interno semelhante ao dos tubos de polietileno mas com a parede interna funcionalizada com o biocatalisador. Os capilares de vidro utilizados tinham 15 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno. Para além do procedimento de funcionalização seguido para as esferas de vidro do biorreactor 2.0, testaram-se outros métodos para as três etapas. Deram origem a um biorreactor capaz de converter acetamida em ião amónio capilares silanizados pelo método de sol-gel e com solvente orgânico.

Silanização pelo Método sol-gel

Relativamente ao procedimento de funcionalização, apenas difere do biorreactor 2.0 o passo da silanização.

O procedimento para a *silanização* teve por base um trabalho desenvolvido por Sequeira et al. [89] tendo sido introduzidas algumas alterações. Preparou-se uma mistura juntando 5,04 ml de etanol pa com 1,30 ml de ácido nítrico 2,3 mol/L e 3,40 ml de 3-aminopropiltriethoxissilano (APTS) (adicionado gota a gota). Manteve-se o pH da solução abaixo de 2 e caso subisse adicionavam-se algumas gotas de ácido nítrico 65 %. Esperaram-se cerca de 40-50 minutos para que ocorresse hidrólise (formação de uma emulsão até a solução ficar de novo transparente). Encheu-se o capilar com a solução e deixou-se em contacto durante 24 horas à temperatura ambiente, renovando-se a solução 5 vezes. Por fim lavou-se o capilar com etanol e de seguida com uma mistura de etanol:água (1:2) ficando este pronto para a etapa seguinte.

Após passar várias vezes tampão HEPES 5 mM (pH 7,1) pelo capilar, o biorreactor ficou pronto para ser usado.

Neste biorreactor testaram-se os dois biocatalisadores: células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10 e o respectivo extracto celular. No caso das células inteiras após a preparação da suspensão celular preparou-se uma solução com uma diluição de 1:3 em tampão HEPES 5 mM (pH 7,1).

O armazenamento destes biorreactores foi feito a 4 ° C em tampão HEPES 5 mM (7,15) com EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 2mM e benzamidina 1 mM.

3.3.4 Sistema de análise em gases

A conversão de amidas pela amidase dá origem a amoníaco e o respectivo ácido carboxílico. De acordo com o pH do meio, o equilíbrio entre as espécies protonadas e desprotonadas vai variar. A pH 11 há total conversão do ião amónio para amoníaco [90], que nas condições de pressão e temperatura ambiente é volátil. Se a este pH a amidase for ainda cataliticamente activa, é possível construir um sensor que faça análises em gases, isto é, no momento da detecção o analito está sob a forma gasosa.

Numa câmara de vidro, foram colocadas contas de alginato de cálcio com extracto celular (procedimento do biorreactor 1.0) em 10 ml de HEPES a pH 11. Havia uma corrente de azoto que entrava na parte inferior da câmara, provocando assim agitação das contas e favorecendo a libertação de compostos voláteis que se poderiam estar a formar. A injeção das soluções de acetamida foi feita com uma seringa através de um invólucro na zona superior da câmara. Se houver formação de amoníaco, este é arrastado com a corrente de azoto até chegar a uma célula de vidro onde está inserido o cristal. Nesta célula, há a divisão do caudal direccionando o gás até às duas faces do cristal.

Mais uma vez, mediu-se a frequência do cristal antes e após a injeção dos padrões. Injectaram-se volumes de 10 µL a 1 ml de um padrão de acetamida de 1000 ppm e 300 µL a 1ml de uma solução de 5000 ppm.

4. Resultados e discussão

4.1 Teste de possíveis interferentes

De modo estudar a selectividade da camada química, inseriu-se um cristal revestido num sistema FIA com água ultrapura como fluxo. Injectou-se uma solução de tampão HEPES 0,01 M (pH 7,15) e acetamida dissolvida também neste tampão. Não se verificou nenhuma resposta, excluindo-se assim a possibilidade de estes dois compostos serem interferentes nas análises.

4.2 Resultados obtidos utilizando um biossensor com dupla camada: química e biológica

4.2.1 Optimização do sistema

O funcionamento desta montagem foi afectado essencialmente por três factores: volume de tampão acima do cristal, preparação do revestimento biológico e a sua aplicação.

4.2.1.1 Volume do tampão

Começou-se por ter apenas 1 ml de tampão acima do cristal e adicionaram-se vários volumes de uma solução de acetamida 1000 ppm (3 a 13 μ L). Obtiveram-se algumas respostas do sensor, no entanto, verificaram-se saltos acentuados na frequência aquando da adição da solução de acetamida. A adição de acetamida provocava uma perturbação no volume acima do cristal dando origem ao salto na frequência que nem sempre voltava aos valores anteriores, dificultando a leitura de uma possível resposta. Por isso, decidiu-se aumentar o volume de tampão para 20 ml tendo ficado resolvido o problema do salto na frequência. Na Figura 20 pode-se ver o perfil de respostas obtidas para os dois casos referidos: a adição de dois volumes da mesma solução de acetamida, uma quando havia 1 ml de tampão na célula do cristal, outra quando havia 20 ml.

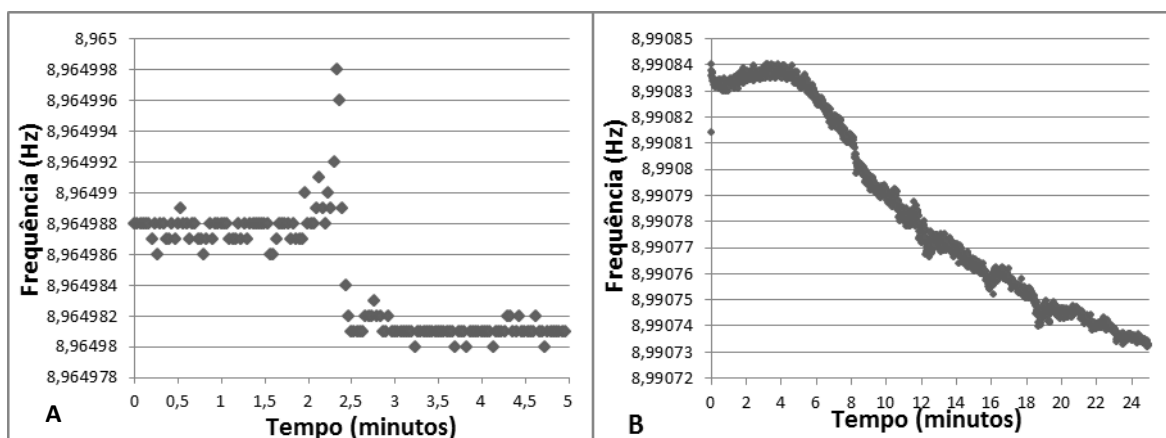


Figura 20: Frequência antes e após adição de acetamida.

A -Adição de 5 μ L de uma solução de 1000 ppm de acetamida sobre 1 ml de tampão.

B- Adição de 300 μ L de uma solução de 1000 ppm de acetamida sobre 20 ml de tampão.

4.2.1.2 Composição do revestimento biológico

Relativamente à preparação do revestimento biológico, a escolha dos *reagentes*, as suas *proporções* e a *ordem de mistura* foram factores determinantes para o sucesso da imobilização do biocatalisador.

Inicialmente dissolveu-se BSA em pó juntamente com o biocatalisador e GA. Devido ao pequeno volume da mistura e à sua viscosidade nem sempre foi possível a dissolução do pó, mesmo diminuindo a sua quantidade. Por isso, trocou-se esta proteína por uma solução de gelatina tendo o mesmo efeito. Com esta mudança, o revestimento biológico adquiriu uma consistência mais gelatinosa. Verificou-se que surgiram alguns problemas na estabilidade da frequência e principalmente a cessação da vibração do cristal com a adição do tampão. De modo a tentar resolver este problema substitui-se de novo a proteína desta vez por uma solução de BSA 15% (m/v).

Para além das dificuldades referidas, a quantidade de BSA e GA afectam a densidade do revestimento biológico. Observou-se várias vezes que ao adicionar uma gota de revestimento, ou após a sua secagem, o cristal deixava de vibrar. A massa elevada sobre o cristal é a causa deste acontecimento, o BSA contribui com o seu peso molecular, e o GA com o seu efeito reticulador. Quanto maior a quantidade de GA maior a reticulação na

mistura tornando-a mais densa. Por outro lado, se estiver em pouca quantidade pode dar origem a um revestimento com pouca adesão e estabilidade. Em alguns ensaios, verificou-se a libertação do revestimento biológico durante as lavagens da célula com tampão, que se atribuiu ao facto de não se ter conseguido uma mistura homogénea. Para além da já referida dificuldade em se dissolver BSA na mistura, se não se adicionasse GA em último lugar, havia a formação de um revestimento bastante espesso e pouco viscoso. Se forem misturados inicialmente BSA e GA dava-se a espontânea formação de um reticulado espesso onde seria difícil a penetração do biocatalisador. Como seria de esperar, este último revestimento levou à paragem na vibração do cristal. Conclui-se que a melhor solução consistia na adição dos reagentes seguindo a sequência: BSA, biocatalisador e GA.

4.2.2 Respostas do biossensor à acetamida

Após a optimização do método de imobilização e condições de análise são demonstrados de seguida alguns resultados obtidos com um cristal com um revestimento químico de 20,6 KHz e biológico (extracto celular) de 4,7 KHz.

A Figura 21 representa uma resposta do biossensor onde há uma descida da frequência após adição de 280 µL de acetamida a 20 ml de tampão. Este decréscimo provém da interacção do revestimento químico com o ião amónio formado a partir da reacção da amidase com a acetamida.

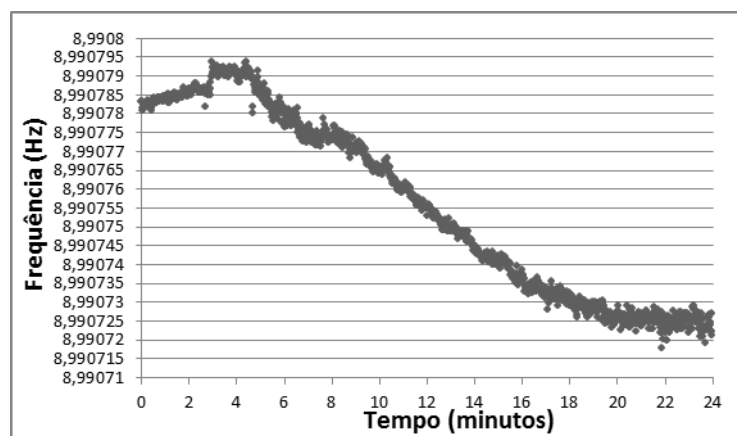


Figura 21: Variação da frequência após injeção de 280 µL de acetamida 1000 ppm

Foi feita uma recta de calibração adicionando-se sucessivamente vários volumes de uma solução de acetamida 1000 ppm e obtendo-se as respostas representadas na Tabela 6 e Figura 22.

Tabela 6: Valores da variação da frequência relativos à adição de acetamida em diferentes concentrações.

[Acetamida] (ppm)	ΔF (Hz)
7,5	10
8	14
8,5	43
9	53
9,5	72

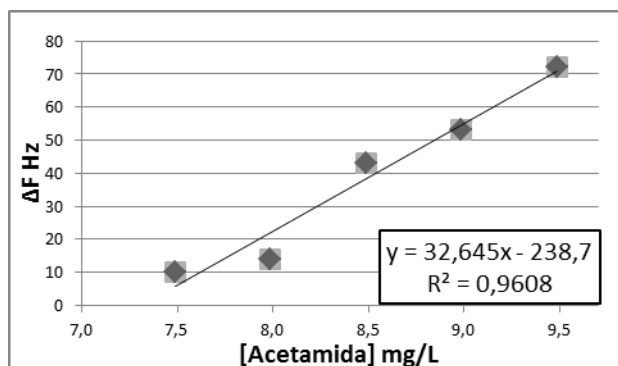


Figura 22: Recta de calibração relativa à variação de frequência vs concentração de acetamida.

Neste caso, a zona de calibração linear está compreendida entre 7,5 e 9,5 ppm. A partir da recta de calibração pode-se retirar a sensibilidade do biossensor sendo esta 32,645 Hz/ppm.

A recta de calibração pode ser representada como:

$$\Delta F \text{ (Hz)} = 32,645 \times [\text{Acetamida}] - 238,7$$

Apesar de se terem conseguido alguns resultados com este sistema, tinha tempos de vida muitos curtos e a estabilidade da frequência era difícil de manter ao longo do tempo. Se o cristal não deixasse de vibrar após a adição do revestimento biológico ou do tampão o

seu tempo de vida são passava de um ou dois dias. A estabilidade da frequência também piorava ao longo desse período. O facto de o revestimento estar em contacto com um líquido pode alterar a sua estrutura “inchando-o” e com as lavagens pode haver libertação do mesmo. O facto de a frequência do cristal geralmente aumentar, pode ser uma evidência do que foi referido anteriormente.

Outro inconveniente que foi surgindo está relacionado com a difícil remoção do revestimento biológico sem interferir com o químico. O procedimento consistia em deixar o cristal em água quente (70 °C) durante 30 minutos a 1 hora e levar-se ao ultra-sons. Nem sempre era possível remover todo o revestimento biológico ou garantir a integridade do revestimento químico. Devido a estas razões, e tendo em conta que, o revestimento químico apresenta uma grande estabilidade e reprodutibilidade, deixou-se esta montagem. Pretendeu-se com as montagens seguintes separar a componente química da biológica, de modo a facilitar a acção de cada uma delas e detectar a origem de problemas nas análises mais facilmente.

4.3 Sistema para análises em Injecção em Fluxo

A solução testada para separar a componente química da biológica garantindo o objectivo final – detecção de amidas, incluiu inserir em FIA um cristal com um revestimento químico e desenvolver um biorreactor com o biocatalisador imobilizado.

As principais variáveis provenientes do biorreactor são a sua geometria (dimensão e forma) e o método de imobilização do biocatalisador. Foram desenvolvidos vários biorreactores como pode ler-se de seguida.

4.3.1 Biorreactor 1.0: Confinamento do biocatalisador em alginato de cálcio

4.3.1.1 Teste da conversão da acetamida pelo biocatalisador imobilizado

O primeiro método de imobilização testado foi a inclusão do biocatalisador em contas de alginato de cálcio. Para verificar a aplicabilidade deste método de imobilização ao biocatalisador em estudo fez-se um pequeno teste. Colocaram-se num copo as 80-90 contas de alginato de cálcio com o biocatalisador em contacto com uma solução de acetamida 400 ppm (5,1 ml) e retiraram-se cinco alíquotas nos primeiros 6 minutos de reacção. Injectaram-se as alíquotas da mistura reaccional no sistema de FIA, sem o biorreactor e com o cristal com o revestimento químico. Verificou-se um decréscimo na frequência para todas as injeções provando-se a possibilidade da conversão de acetamida em ião amónio imobilizando o biocatalisador por este método.

A Figura 23 e a Tabela 7 mostram que a conversão da acetamida pelo biocatalisador imobilizado nas contas de alginato de cálcio se dá rapidamente. O primeiro ponto foi obtido após 15 segundos de contacto entre o biocatalisador e a acetamida.

Tabela 7: Variação da frequência obtida com a injeção da mistura reaccional ao longo de 6 minutos.

Tempo de reacção (min)	Δ (Hz)
0,25	97
1	214
2,25	181
4	195
6	23

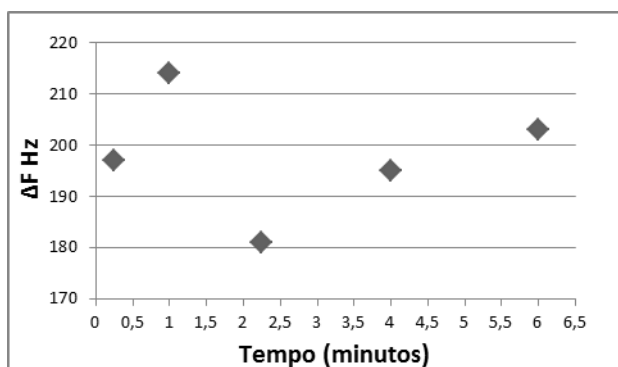


Figura 23: Variação da frequência para diferentes tempos de reacção entre contas de alginato de cálcio e uma solução de acetamida 400 ppm.

4.3.1.2 Optimização do empacotamento das contas de alginato de cálcio

Testaram-se vários modos de empacotamento no tubo. Foi impossível empacotar apenas contas de alginato de cálcio pois surgiram muitos problemas de pressão devido à sua natureza gelatinosa. Estes deram origem a fugas de tampão ao longo do sistema e

forçaram o colapsamento das contas impedindo a passagem do fluxo. É possível aumentar a dureza das contas, aumentando a concentração de alginato de sódio. Contudo, este aumento de densidade na rede formada, diminui a porosidade nas contas, dificultando a difusão do substrato e produto com o meio envolvente. A solução foi intercalar as contas com esferas de vidro de 5mm, de modo a limitar a mobilidade das contas por acção do seu peso. A estabilidade das contas também foi optimizada, não alterando o procedimento de síntese mas alterando o tampão. Inicialmente o tampão tinha na sua constituição EDTA. Sendo este um agente quelante forma complexos com iões metálicos entre eles o cálcio, constituinte das contas. Verificou-se que as contas após algum tempo em contacto com o tampão perdiam a forma. Reformulou-se a constituição do tampão usado nas análises em FIA, removendo-se o EDTA.

4.3.1.3 Respostas do método bioanalítico à acetamida

Verificou-se a interferência da temperatura nas respostas, como é possível observar na Figura 24. As injecções feitas da parte da manhã, quando a temperatura era de 21 °C apresentaram menores respostas que as feitas da parte da tarde com a temperatura a variar entre 23 e 24°C. O padrão com concentração de 600 ppm teve uma resposta de 18 Hz quando injectado de manhã e de 100 Hz da parte da tarde. Seria de esperar que as injecções da parte da tarde dessem origem a respostas menores, pois são de padrões de acetamida menos concentrados.

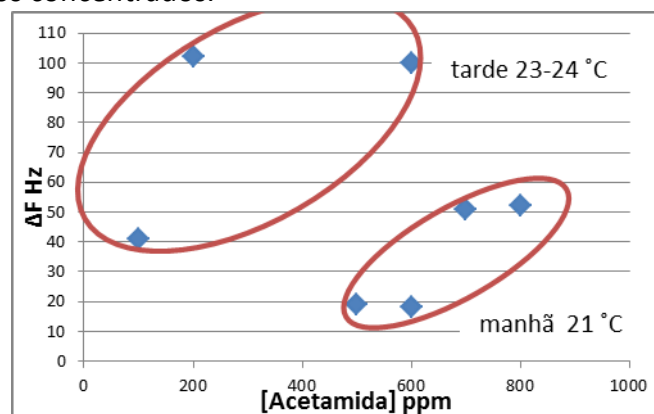


Figura 24: Variação da frequência para diferentes concentrações de Acetamida.

Quando se deixou de observar respostas, voltou-se a fazer o teste das contas num copo em contacto com uma solução de acetamida com agitação. Bastaram 30 segundos para detectar a presença do composto deduzindo-se que o problema estaria na geometria do biorreactor. A interacção entre as contas e a acetamida em suspensão é completamente diferente da que ocorre num tubo com um fluxo a passar principalmente devido ao menor tempo de contacto. A dificuldade em manter a geometria do biorreactor, mesmo na presença de esferas de vidro afectou todo o processo de interacção do analíto com o biocatalisador traduzindo-se numa variação do caudal. Este justifica a variabilidade no perfil e na amplitude das respostas tal como nos tempos de chegada do analíto ao cristal (2 a 5 minutos). Para que ocorra catálise, a acetamida tem que se difundir para as contas e os respectivos produtos para fora delas. O diâmetro interno do biorreactor é superior aos tubos do sistema, isto leva a que o fluxo não faça sempre o mesmo percurso quando passa por ele, afectando também os resultados obtidos.

4.3.2 Biorreactor 2.0: funcionalização de esferas de vidro

De modo a evitar os problemas de difusão e manutenção da geometria do biorreactor, referidos no ponto anterior, inseriram-se no tubo esferas de vidro funcionalizadas com o biocatalisador.

A partir deste biorreactor obtiveram-se algumas respostas na gama de concentrações 162,5 a 432,4 ppm. No entanto, tal como no biorreactor 1.0, não se verificou reprodutibilidade nas respostas nem proporcionalidade entre estas e a concentração de acetamida como se pode verificar na Figura 25. Apesar dos caudais serem diferentes, pode verificar-se que as maiores respostas foram obtidas com um cristal com uma maior quantidade de revestimento.

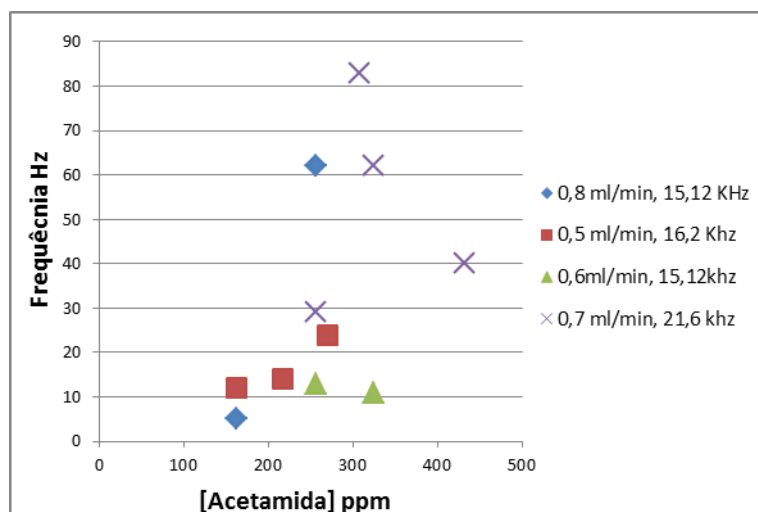


Figura 25: Respostas obtidas após injeção de vários padrões a várias velocidades e com várias quantidades de revestimento químico.

Surgiram problemas idênticos aos associados à geometria do biorreactor 1.0, o fluxo tem que passar por esferas, não percorrendo necessariamente o mesmo trajecto dando origem a variações no caudal. Para além desta causa, surgiram outras dificuldades instrumentais que dificultaram o controlo do caudal. Esta variação, justifica os valores obtidos para as respostas e os tempos de chegada (4 a 8 minutos). Na Figura 26 está representada uma resposta após injeção de uma solução de acetamida de 324,5 ppm.

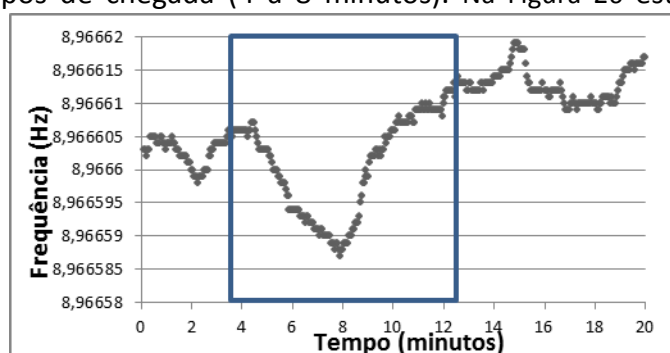


Figura 26: Variação da frequência após injeção do padrão de acetamida de 324,3 ppm.

Deste teste, pode-se retirar o sucesso da imobilização do biocatalisador através da silanização em meio orgânico.

4.3.3 Biorreactor 3.0: funcionalização das paredes de um capilar

Descartada a primeira hipótese para a imobilização do biocatalisador, procurou-se outro método de modo a conseguir maior reprodutibilidade nos resultados. Estão retratados na

bibliografia vários sistemas de FIA com biorreactores, onde o biocatalisador está imobilizado no empacotamento de um tubo. O empacotamento pode ser de várias naturezas como por exemplo esferas de vidro [91] e Amberlite® [92], tendo uma característica em comum que é a sua dimensão, na ordem dos micrómetros. Após a falta de bons resultados com os biorreactores anteriores e de modo a contornar o preço deste tipo de empacotamento, testou-se o mesmo tipo de imobilização mas nas paredes de um capilar de vidro. O objectivo é conseguir uma funcionalização homogénea ao longo do capilar, tendo este um diâmetro interno semelhante ao dos tubos do sistema. Assim, não há grandes alterações de pressão na zona do biorreactor e o percurso do fluxo não sofre alterações. Outra razão para o biorreactor não ter um diâmetro interno significativamente elevado é o facto de se pretender que haja a maior interacção possível entre o fluxo e as paredes funcionalizadas.

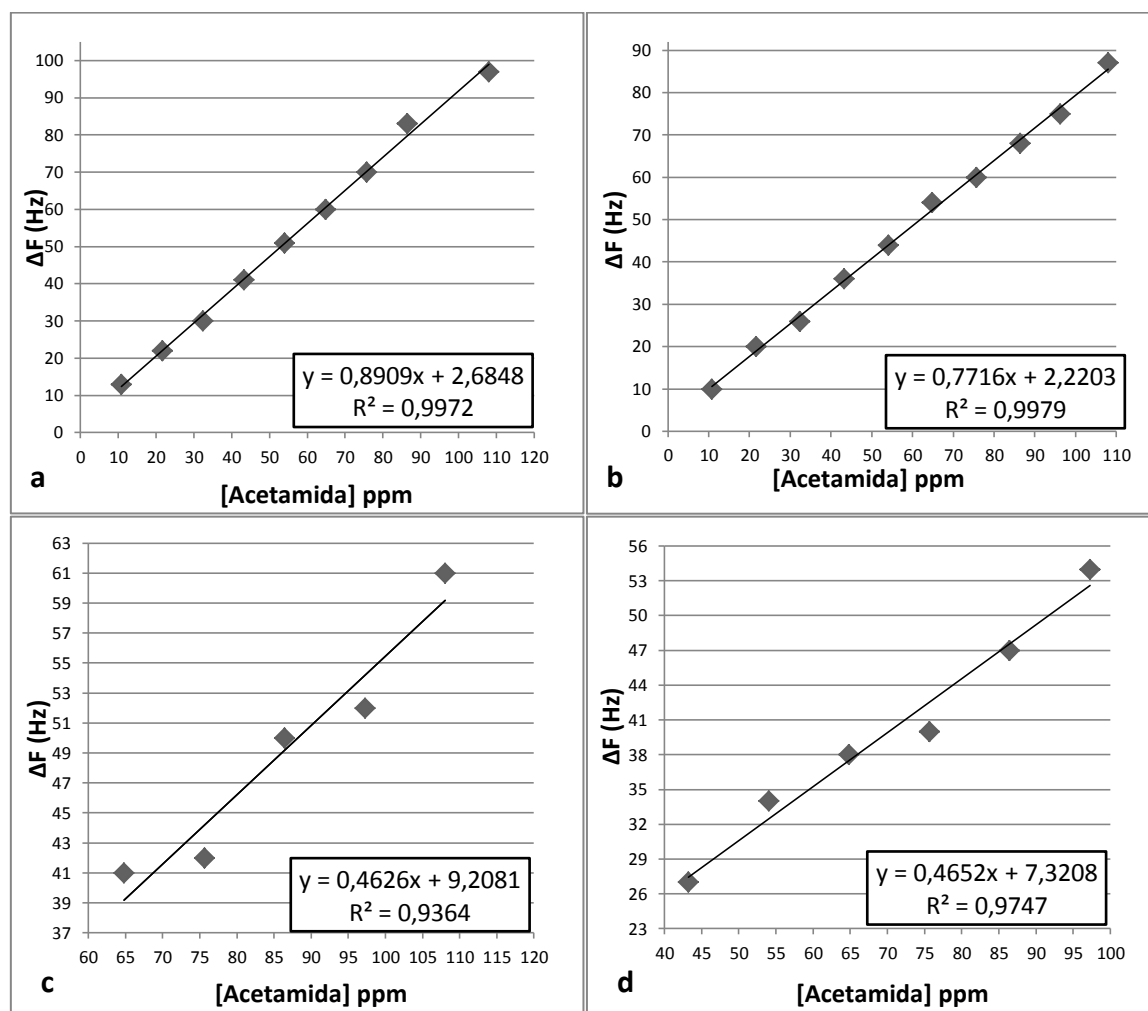
Para a funcionalização das paredes de vidro foi necessário proceder à sua silanização. Foram testados vários métodos para este efeito, entre os quais o método de sol-gel, promoção da reacção em solventes orgânicos e por acoplamento a vapor. Conseguiram-se resultados da funcionalização do capilar apenas com os dois primeiros métodos.

4.3.3.1 Resposta do método bioanalítico à acetamida com funcionalização das paredes do capilar pelo método sol-gel

A hidrólise e condensação dos silanos pode ocorrer por catálise ácida ou básica [86]. Seguiram-se os procedimentos para ambos os casos e apenas o que se deu em ambiente ácido deu origem a resultados na interacção com acetamida. A existência de resposta à acetamida depende de vários factores. No caso do método sol-gel, o grau de condensação está dependente do tipo de catálise que se usa, do solvente, da concentração dos reagentes, do tipo de percursor utilizado e da temperatura [86]. O controlo do pH é crucial, embora, experimentalmente, o seu controlo não tenha sido feito ininterruptamente durante as 24h que demorou o processo. Em ambiente ácido, para que ocorra a hidrólise dos silanos, o pH tem que estar abaixo de 2. Após a hidrólise, a condensação é impulsionada por um ténue aumento do pH até 4. Se se passar

consideravelmente deste valor, ocorre gelificação da solução, o que não é pretendido. Os resultados que se seguem são provenientes de uma coluna em que os procedimentos de silanização não incluíram o passo da subida do pH de 2 para 4, necessário para que ocorresse a condensação. Contudo, obtiveram-se resultados da conversão da amida, provando-se que a silanização ocorreu. O facto de a imobilização ter sido conseguida, mesmo neste caso, pode ser explicado pelo longo tempo de contacto entre a solução de silanização e o capilar. Durante este tempo, poderá ter havido um aumento do pH, ou alteração da temperatura, que acabou por promover a condensação.

Procedeu-se então à funcionalização de um capilar com um diâmetro interno de 0,8 mm. O cristal inserido em FIA tinha 23,22 Kz de revestimento químico. Na Figura 27 mostram-se as rectas de calibração para diversas concentrações de acetamida, obtidas em diferentes dias de análise.



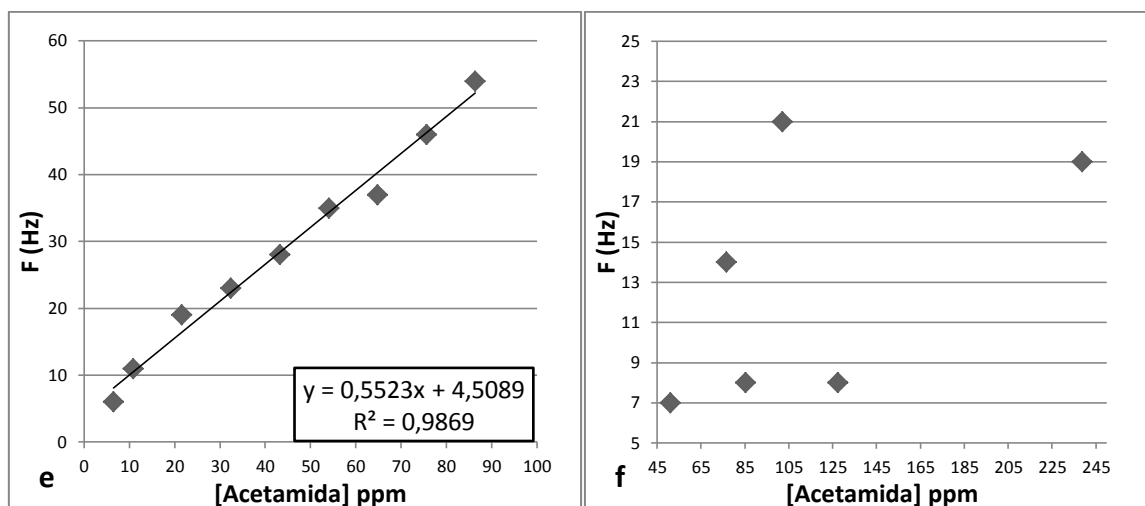


Figura 27: Respostas à acetamida obtidas ao longo de 6 dias de análise. Biorreactor com a- 3 dias, b- 4 dias, c- 5 dias, d-6 dias, e-10 dias, f-14 dias.

Na Figura 28 apresentam-se duas curvas de calibração completas, cujas zonas lineares já se puderam ver nos gráficos da Figura 27. A diminuição nas respostas que se observam para as concentrações mais elevadas pode ser explicada pela inibição do substrato. A partir de uma certa concentração de acetamida, o centro activo da enzima é ocupado por duas moléculas de substrato, não ocorrendo catálise e levando à diminuição da resposta [80].

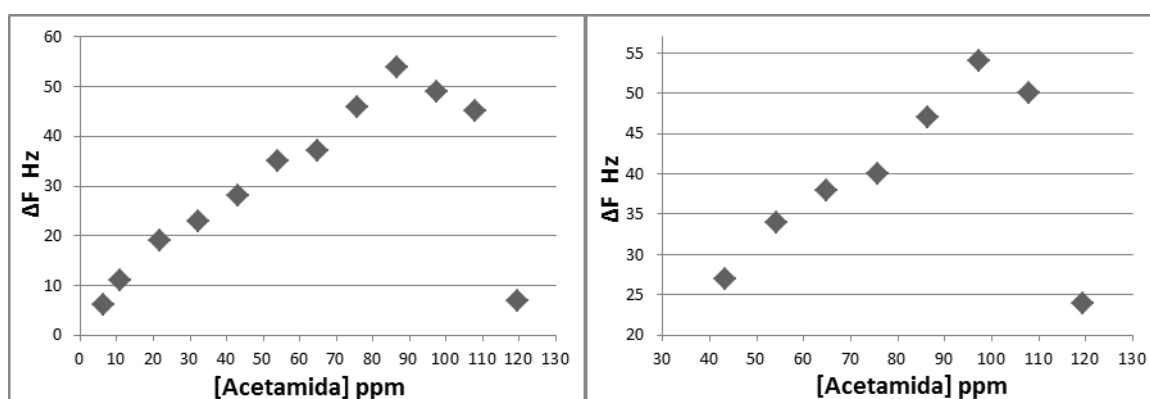


Figura 28: Curvas de calibração para o 6º e 7º dia de análise

Conseguiram-se obter respostas no biossensor proporcionais à concentração de acetamida até ao 10º dia de vida do biorreactor. O 1º e o 2º dia de análises não são aqui considerados pois foi utilizado outro cristal com menos revestimento e menos estável. O

desempenho do método bioanalítico pode ser analisado a partir da equação da recta de calibração. Verifica-se que há um decréscimo na sensibilidade do método com o passar dos dias, à excepção do 6º e 10º dias. No 6º dia, fizeram-se algumas modificações no sistema devido a problemas de estabilidade do cristal, que podem justificar a ausência de perda na sensibilidade. Na Figura 29 estão representadas as respostas obtidas com a injeção dos vários padrões do dia 3 até ao dia 7. As respostas vão sendo menores ao longo do tempo, excepto a partir do dia 6, data em que as respostas aumentam em vez de continuar a descer.

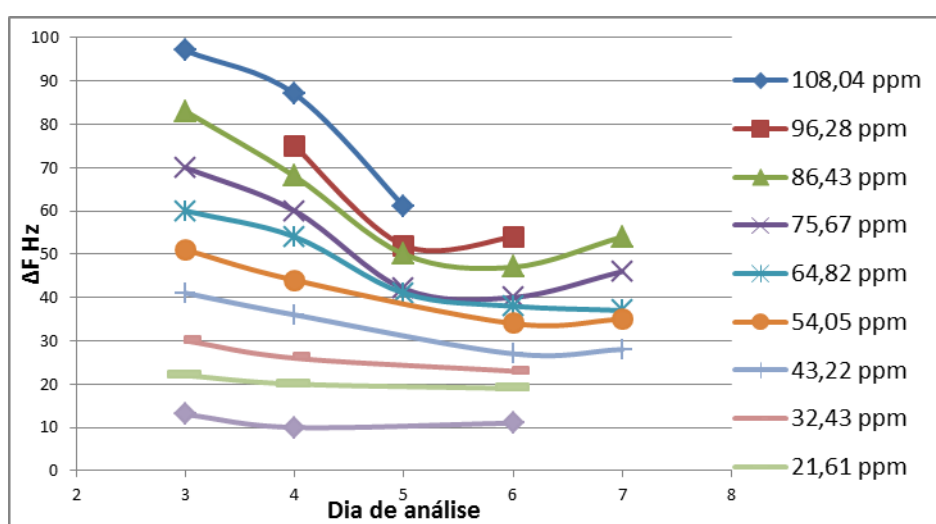


Figura 29: Gráfico representando o decréscimo da resposta do biossensor aos padrões com o passar dos dias.

Na Figura 30 podem-se observar várias respostas obtidas após a injeção de alguns padrões de acetamida. Na Figura 31 foi ampliada uma resposta evidenciando o tempo que o biossensor demorou a responder e a recuperar. São necessários sensivelmente 5 minutos para que o biossensor responda a uma injeção e esteja recuperado para uma nova análise. Comparando este biorreactor com os anteriores os tempos de resposta são mais rápidos. Esta rapidez pode-se associar ao facto do biorreactor não ter empacotamento.

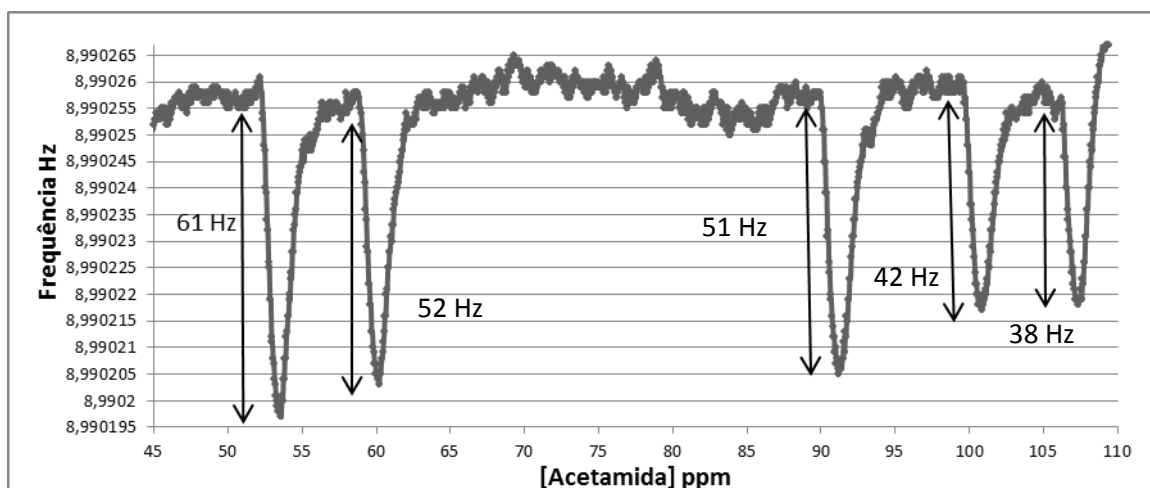


Figura 30: Respostas obtidas com a injeção de vários padrões de acetamida: 108,04; 97,28; 97,28; 76,67 e 86,42 ppm. Os sinais são correspondentes aos últimos cinco pontos da recta de calibração do gráfico c na Figura 27.

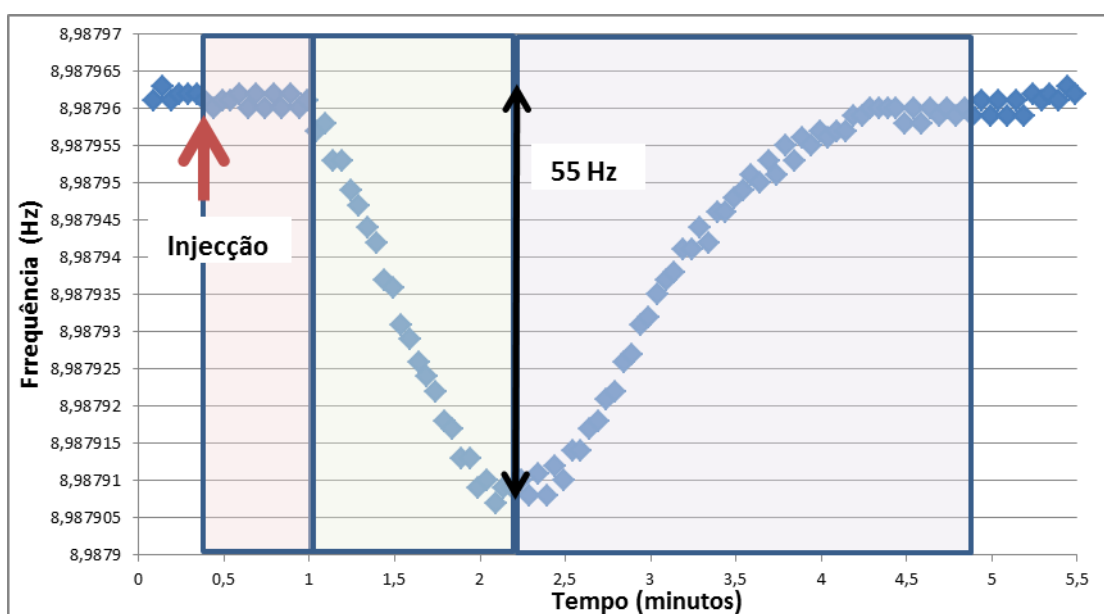


Figura 31: Resposta obtida após injeção do padrão de acetamida de 75,7 ppm.

Fazendo uma análise dos resultados obtidos, podem-se tirar algumas conclusões. A durabilidade do método bioanalítico foi de 10 dias, durante os quais respondeu proporcionalmente à concentração de acetamida. A partir do 14º dia as respostas tornaram-se irreprodutíveis e/ou passaram a alternar com ausências de resposta às injeções. A perda de funcionalidade do biorreactor pode ter duas causas: inactivação da

amidase e/ou lixiviação da mesma. A inactivação poderia ainda ter ocorrido por alteração significativa do pH do meio ou da temperatura. Nenhuma destas duas últimas hipóteses parece provável, uma vez que o fluxo era composto por tampão HEPES, para manter o pH, e a temperatura variou entre 21-26 °C ao longo dos dias de análise, sabendo-se que a esta gama de temperaturas a amidase é activa. Por isso, o mais provável foi ter ocorrido lixiviação da amidase com a passagem do fluxo. Uma explicação para esta lixiviação é a hidrólise das iminas formadas no processo de imobilização com o GA. No entanto, em estudos anteriores [57] não foram reportados problemas, por isso não se adicionou nenhum agente redutor como boro-hidreto de sódio para reduzir imina a amina, tornando a espécie não hidrolisável.

Tentou-se reproduzir a imobilização noutros tubos, usados e novos, mas sem sucesso. A preparação do biorreactor envolve três passos, bastando um deles não correr como o esperado para influenciar todo o processo. A limpeza das paredes do capilar pode ter sido ineficaz. Com a silanização formam-se ligações covalentes, e por isso, ligações difíceis de quebrar. Apesar dos reagentes usados na limpeza serem agressivos para o vidro, podem não conseguir remover na totalidade a camada que se formou com a imobilização do biocatalisador. Esta remoção incompleta pode levar a uma irregularidade na superfície complicando o novo ciclo de reacções a que poderá estar sujeito o capilar, contribuindo para a difícil reprodutibilidade do processo. Mesmo com capilares novos a silanização é um processo onde nem sempre se consegue reprodutibilidade e eficiência. Mesmo que o processo tenha sido eficiente é necessário que haja um determinado número de grupos amino disponíveis. Em experiências posteriores, fez-se uma silanização adicional, também denominada de “capping” de modo a aumentar o número de grupos amino disponíveis. Outro passo importante no processo de funcionalização das paredes do capilar é a lavagem de um passo para outro. Esta tem de ser feita com o solvente do composto utilizado anteriormente, de modo a arrastar as moléculas não ligadas covalentemente. Se esta lavagem não for eficiente, por exemplo após a silanização, ocorrerá imobilização sobre uma porção não ligada covalentemente. Há uma grande probabilidade de esta ser arrastada noutras lavagens ou mesmo no sistema FIA.

Tendo em conta as dificuldades e complicações referidas na imobilização do biocatalisador por este processo, decidiu-se modificar a metodologia .

4.3.3.2 Resposta do método bioanalítico à acetamida com funcionalização das paredes do capilar em meio orgânico

Com este método de sinalização funcionalizaram-se as paredes do biorreactor com células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10. Seguiu-se o procedimento para dois capilares, tendo-se obtido respostas em ambas, embora mais uma vez tenha sido difícil encontrar proporcionalidade entre as respostas e as concentrações injectadas. Com o primeiro capilar foi possível verificar que havia proporcionalidade nas respostas relativamente à concentração de acetamida no então com elevada dispersão de resultados, como é possível observar na Figura 32. Esta dispersão pode ser explicada por dificuldades instrumentais, nomeadamente na manutenção de um caudal de arraste constante. No segundo capilar, na maioria das vezes não se verificava uma proporcionalidade na variação da frequência com a concentração da acetamida injectada. As principais causas atribuídas são à dificuldade em manter o caudal constante e o ruído observado. No segundo teste verificou-se um fenómeno que pode também afectar o desempenho do cristal. Sendo este o arrastamento de células inteiras e posterior deposição sobre o cristal, que ficou patente quando após se ter retirado o biorreactor do sistema se obteve a resposta à acetamida. Também, ao retirar o cristal da célula, se notou uma consistência diferente da habitual sobre o eléctrodo.

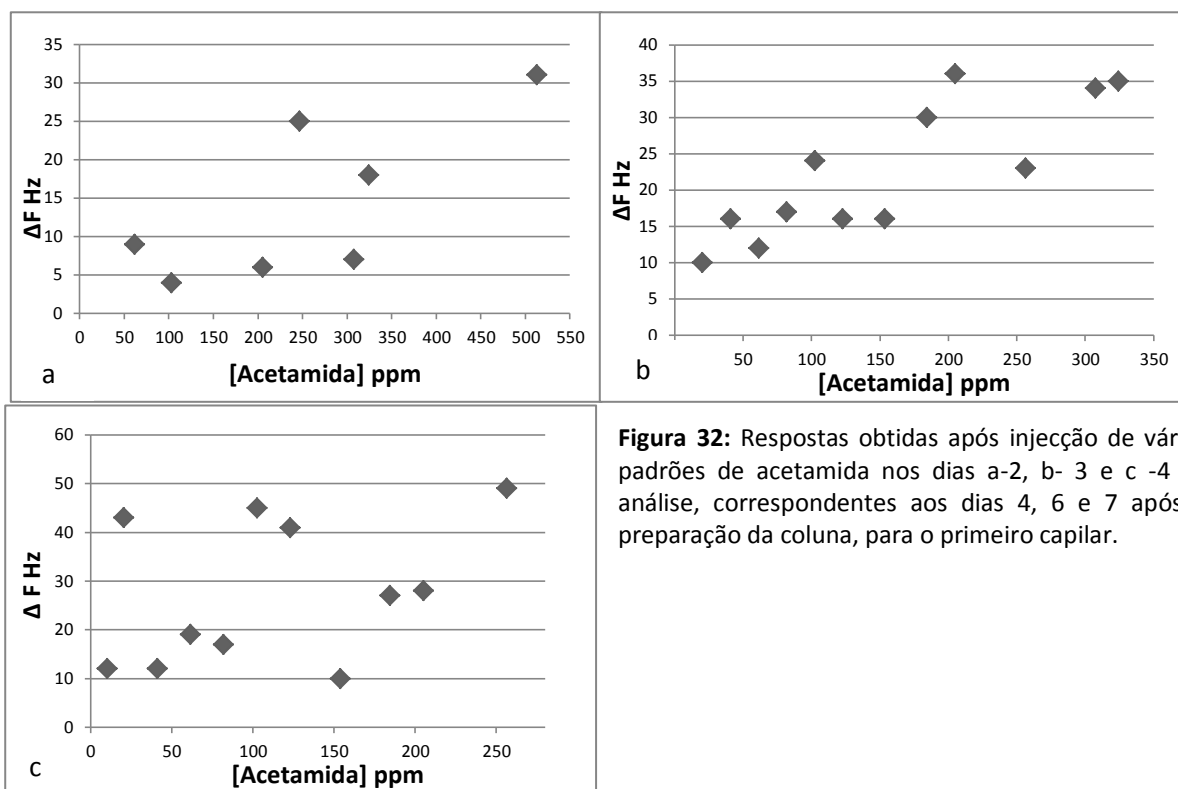


Figura 32: Respostas obtidas após injeção de vários padrões de acetamida nos dias a-2, b- 3 e c -4 de análise, correspondentes aos dias 4, 6 e 7 após a preparação da coluna, para o primeiro capilar.

4.4 Sistema de análises em gases

Os biocatalisadores quando imobilizados, podem ser cataliticamente activos em valores de pH ou temperatura fora da gama conhecida para a forma livre [93]. Pôs-se a hipótese de estando a amidase imobilizada, esta conseguir estar cataliticamente activa a pH 11, uma vez que foram feitos estudos desta enzima a pH 10 [74]. No entanto, não se observaram quaisquer respostas neste sistema rejeitando-se a hipótese proposta. Para confirmar este facto, puseram-se as contas em contacto com uma solução de acetamida sob agitação ao mesmo pH. Retiraram-se alíquotas para verificar a presença do ião amónio num sistema FIA apenas com o cristal com o revestimento químico. Não se observou qualquer tipo de resposta, provando-se assim que a amidase não estava cataliticamente activa.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O objectivo do trabalho foi desenvolver um biossensor para amidas, mais especificamente para acetamida e acrilamida. Para a sua concretização associaram-se uma componente biológica e uma componente química. A enzima Amidase foi a componente biológica usada, estando presente em células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa* L10 ou no respectivo extracto celular. Um dos produtos da conversão de acetamida pelo biocatalisador é o ião amónio. A componente química do sistema é um revestimento de um sensor acústico sensível a iões amónio. Logo a componente química interage com o produto da conversão mediada pela componente biológica. Este produto da conversão foi detectado pela variação da frequência de um cristal piezoeléctrico.

Começou-se por usar as duas componentes como revestimentos depositados sobre o cristal. Obtiveram-se respostas, imobilizando quer células inteiras quer extracto celular. No entanto, o tempo de vida dos biossensores não passava dos dois dias, era difícil manter a estabilidade da frequência e a remoção de apenas um revestimento aquando da sua substituição era complicada.

Decidiu-se separar as duas componentes, química e biológica, inserindo-as num sistema de FIA. Testaram-se vários métodos de imobilização do biocatalisador, tendo-se obtido respostas da conversão de acetamida em todos eles. Confinou-se o extracto celular em contas de alginato de cálcio que se inseriram num tubo de 0,6 cm de diâmetro interno. Os problemas deste biorreactor eram diversos estando principalmente associados à dificuldade em manter o caudal e a geometria do empacotamento variando o perfil das respostas e os tempos de chegada do analito ao cristal, após as injeções.

Continuaram-se a usar esferas, mas de vidro que foram funcionalizadas com o biocatalisador (extracto celular). Procedeu-se à limpeza e activação do vidro, silanização com solvente orgânico e APTS e reticulação do biocatalisador com GA. Mais uma vez

repetiram-se os problemas com a manutenção do caudal. Obtiveram-se tempos de resposta mais longos do que com as contas de alginato de cálcio e não se verificava nenhuma proporcionalidade entre a magnitude das respostas e a concentração de acetamida.

Mudou-se de estratégia e começou-se a funcionalizar o interior de capilares de vidro de 0,8 mm de diâmetro interno. A funcionalização teve como variável o método de silanização. Usando o mesmo método aplicado às esferas de vidro, funcionalizou-se o interior de capilares com células inteiras. Verificou-se uma correlação entre as respostas e a concentração dos padrões injectados, embora fosse elevada a dispersão dos resultados. A variação do caudal, a lixiviação e deposição do biocatalizador no cristal ocorriam com frequência levando a respostas aleatórias. Por último, obtiveram-se melhores resultados com a silanização pelo método sol-gel. O método bioanalítico respondeu linearmente à conversão da acetamida durante 10 dias. Nem sempre se conseguiu uma silanização reprodutível e um sistema estável, o que não permitiu obter mais resultados. Testou-se também a silanização por acoplamento a vapor não se tendo obtido resultados. Uma das possíveis causas poderá ter sido a rápida evaporação da acetona por não se ter conseguido tapar completamente as extremidades do capilar.

Em conclusão pode dizer-se que os métodos de imobilização que deram origem à formação de uma ligação química do biocatalisador a uma superfície via crosslinking apresentaram mais estabilidade que o método de confinamento em alginato de cálcio.

Tendo como perspectiva continuar este trabalho, o modelo a seguir para o método bioanalítico será a imobilização do biocatalisador num biorreactor e a inserção deste num sistema FIA tendo como detector um sensor acústico sensível a iões amónio. O método de imobilização através da silanização com solvente orgânico terá de ser optimizado, aumentando a quantidade de biocatalisador e aminosilano e aplica-lo ao extracto celular. De modo a obter maior informação relativamente a este processo quantificar a proteína que ficou imobilizada e dosear a actividade do biocatalisador na forma livre e

imobilizada. A quantidade de revestimento químico também terá de ser estudada, garantindo que ocorra detecção do analíto formado no biorreactor. Deste modo, será possível eliminar os problemas de irreprodutibilidade nas respostas e nos tempos de chegada tal como na proporcionalidade entre a amplitude das respostas e a concentração de acetamida injectada.

Se se pretender deixar de se utilizar FIA, pois neste caso ocorrerá sempre lixiviação do biocatalizador, uma possível hipótese será fazer a imobilização do biocatalizador na célula do cristal usada para o biossensor de dupla camada. Deste modo, o cristal seria revestido apenas com a camada sensível a amoníaco e iões amónio, e a conversão seria feita nas paredes da célula ou mesmo no reservatório da solução a analisar.

Bibliografia

1. McMurry, J; *Organic Chemistry*; 7 ed; Thomson Brooks Cole; 2007; p. 813.
2. Nykanen L. e Suomalainen H.; *Aroma of beer, wine, and distilles alcoholic beverages.*; Berlin; Kluwer Academic Publishers; 1983; p.288.
3. Oxford Universit; *MSDS - Safety data for acetamid*;; atualizado em 13/02/200; consultado em 8/12/2010; disponível em <http://msds.chem.ox.ac.uk/AC/acetamide.html>.
4. DiGeronimo, M.J. e Antoine A.D.; *Metabolism of acetonitrile and propionitrile by Nocardia rhodochrous LL100-21*; *Appl. Environ. Microbio.*; 1976; 31(6), p. 900-906.
5. National Library of Medicine. *Hazardous Substances; Data Bank– Acetamide*; atualizado em 07/09/2010; consultado em 11/12/201; disponível em <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~YObsc3:1>.
6. Chang L., Brunch M.D., Griskowitz, N.J. e Dentel, S.K., *NMR spectroscopy for determination of cationic polymer concentrations*; *Wartes*, 2002; 36(9): p. 2255-2264.
7. Wong, C.S.; *Environmental fate processes and biochemical transformations of chiral emerging organic pollutants*; *Anal. Bioanal. Che.*; 2006(386): p. 544-558.
8. Acetamide MEA; acedido em 12/08/2011; consultado em http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient_more_details.php?ingredient_id=1069.
9. Klaassen, C.D., Casarett & Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6th ed, ed. McGraw-Hill. 2001, New York: McGraw-Hill.
10. *Some Anti-Thyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals*; IARC; 1974.
11. *Overall Evaluations of Carcinogenity: An updating of IARC Monographs, volumes 1 to 42*; IARC, 1987.
12. *Re-evaluation of some organic chemicals, hydazine and hydrogen peroxide.*, IARC, Editor. 1999.
13. U.S.; E.P.; *Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potentia*;; H.E.D. Science Information Management Branch; *Office of Pesticide Programs.*. 2008.
14. *Decisão da comissão de 27 de Março de 2006 que altera a Decisão 1999/217/CE no que se refere ao repertório das substâncias aromatizantes utilizadas nos géneros alimentícios, Comunidade Europeia*, 2006, *Jornal Oficial da União Europeia*.
15. Friedman, M., *Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review*. *J. Agric. Food Chem.*, 2003. 51(16): p. 4504-4526.

16. Oxford University. MSDS - Safety data for acrylamide. atualizado em 7/02/2005, acessado em 8/12/2010; consultado em <http://msds.chem.ox.ac.uk/AC/acrylamide.html>.
17. Acrilamida, a nova preocupação, in Monografia - Toxicologia e Análises Toxicológicas I. 2003, Faculdade de Farmácia Universidade do Porto.; Porto.
18. Friedman, M., Application of the S-Pyridylethylation Reaction to the Elucidation of the Structures and Functions of Proteins. *J. Protein Chem.*, 2001. **20**(6): p. 431-453.
19. Smith, E.A., S.L. Prues, e F.W. Oehme, Environmental Degradation of Polyacrylamides. 1. Effects of Artificial Environmental Conditions: Temperature, Light, and pH. *E E S*, 1996. **35**(2): p. 121-135.
20. Smith, E.A., S.L. Prues, e F.W. Oehme, Environmental Degradation of Polyacrylamides. *E E S*, 1997. **37**(1): p. 76-91.
21. Vesper, H.W., Bernert, J. T.; Ospina, M; Meyers, T.; Ingham, L.; Smith, A.; Myers, G. L.; Assessment of the relation between biomarkers for smoking and biomarkers for acrylamide exposure in humans. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2007. **16**(11): p. 2471-2478.
22. Healthy, E.P. White sugar: The no nutrition food, acessado em 22/11/2010; consultado em <http://www.healthy-eating-politics.com/white-sugar.html>.
23. Keramat, J.; LeBaio, A.; Prost, C.; Soltanizadeh, N.; Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food Bioprocess Technol.*, 2010: p. 1-24.
24. Gökmen, V. e T. Palazoğlu, Acrylamide Formation in Foods during Thermal Processing with a Focus on Frying. *Food Bioprocess Technol.*, 2008. **1**(1): p. 35-42.
25. Gargas, M.L.; Kirman, C. R.; Sweeney, L. M. e Tardiff, R. G.; Acrylamide: Consideration of species differences and nonlinear processes in estimating risk and safety for human ingestion. *Food Chem. Toxicol.*, 2009. **47**(4): p. 760-768.
26. Tardiff, R.G., Tardiff, Robert G.; Gargas, M. L.; Kirman, C. R.; Leigh C. M. e Sweeney, L. M.; Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food Chem. Toxicol.*, 2010. **48**(2): p. 658-667.
27. Lin, Y; Lagergren, J. e Lu, Y.; Dietary acrylamide intake and risk of esophageal cancer in a population-based case-control study in Sweden. *Int. J. Cancer*, 2011. **128**(3): p. 676-681.
28. Hogervorst, J.G.; Schouten, L. J.; Konings, E. J.; Goldbohm, R. A. e Van Den Brandt, P. A.; Dietary acrylamide intake and the risk of renal cell, bladder, and prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008. **87**(5): p. 1428-1438.
29. Wilson, K.M.; Mucci, L. A.; Rosner, B. A. e Willett, W. C. , A prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2010. **19**(10): p. 2503-15.

30. Kesson, C.M., D.H. Lawson, e A.W. Baird, *Acrylamide Poisoning*. *Postgrad. Med. J.*, 1977. **53**(615): p. 16-17.
31. Swaen, G.M.H.; Haidar, S.; Burns, C. J.; Bodner, K.; Parsons, T.; Collins, J. J. e Baase, C.; *Mortality study update of acrylamide workers*. *Occup. Environ. Med.*, 2007. **64**(6): p. 396-401.
32. Bergmark, E., *Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Acrylonitrile in Laboratory Workers, Smokers and Nonsmokers*. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997. **10**(1): p. 78-84.
33. Grocery Manufacturers Association. *Perspective on Acrylamide*. *Acrylamide Facts* atualizado em 16/06/2010, acedido em 17/11/2010; consultado em: <http://www.acrylamidefacts.org/Perspective-on-Acrylamide.aspx>.
34. Directiva 1999/45/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Maio de 1999 relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados--Membros respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das preparações perigosas, Comissão Europeia, Editor. 1999.
35. Regulamento (UE) Nº 366/2011 da comissão de 14 de Abril de 2011 que altera o Regulamento (CE) nº 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH), no que respeita ao anexo XVII (acrilamida), in 366/2011, C. Europeia, Editor. 2011: Jornal Oficial da União Europeia.
36. Commission Recommendation of 29 April 2004 on the results of the risk evaluation and the risk reduction strategies for the substances: acetonitrile; acrylamide; acrylonitrile; acrylic acid; butadiene; hydrogen fluoride; hydrogen peroxide; methacrylic acid; methyl methacrylate; toluene; trichlorobenzene., Comissão Europeia, Editor. 2004: Jornal Oficial da União Europeia,.
37. Recomendação da Comissão de 2 de Junho de 2010 relativa à monitorização dos teores de acrilamida nos alimentos, Comissão Europeia, Editor. 2010: Jornal Oficial da União Europeia,.
38. Recomendação da Comissão de 3 de Maio de 2007 relativa ao controlo dos teores de acrilamida nos alimentos, Comissão Europeia, Editor. 2007: Jornal Oficial da União Europeia.
39. *Segurança e Saúde do Trabalho , Valores limite de exposição profissional a agentes químicos*, Instituto Português da Qualidade, Editor. 2007: Portugal.
40. *Guidelines for drinking water quaity*, WHO, 2008.
41. *Method no 2084 - Acetamide*, Department of Labour, Occupational Safety & Health Administration; 1987, United States
42. Diekmann, J., A. Wittig, e R. Stabbert, *Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Acrylamide and Acetamide in Cigarette Mainstream Smoke after On-Column Injection*. *J. Chrom. Sci.*, 2008. **46**(7): p. 659-663.

43. Bernard A, O., *Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. J. Chromatograph. A*, 2001. **913**(1-2): p. 113-122.
44. E.A. Lee e A.P. Strahan, *Methods of analysis by the U.S. Geological survey organic geochemistry research group - determination of acetamide herbicides and their degradation products in water using online solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. 2003, U.S Department on the Interior, U.S Geological Survey.
45. Acrylamide, acrylonitrile and acrolein by High performance liquid chromatography (HPLC), in *Method 8316*, EPA. 1994.
46. Acrylamide by gas chromatography, in *Method 8032A*, EPA,. 1996.
47. Cutié, S S e Kallos, G.J.; *Determination of Acrylamide in Sugar by Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem.*, 1986. **58**(12): p. 2425-2428.
48. Schultzova J. e Tekel .J., *Acrylamide monomer occurrence in sugar. Dtsch. Lebensm-Rundsch*, 1996. **92**(9): p. 281-282.
49. Barber, D.S.; Hunt, J.; LoPachin, R.M. e Ehrich, M.; *Determination of acrylamide and glycidamide in rat plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2001. **758**(2): p. 289-293.
50. Rosen, J. e K.-E. Hellenas, *Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analyst*, 2002. **127**(7): p. 880-882.
51. Kim, C.T; Hwang, E.-S. e Lee, H.J; *An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. Food Chem.*, 2007. **101**(1): p. 401-409.
52. Kleefisch, G., et al., *Quartz Microbalance Sensor for the Detection of Acrylamide. Sensors*, 2004. **4**(9): p. 136-146.
53. Stobiecka, A.,. Radecka, H. e Radecki J.,; *Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. Biosens. Bioelectron.*, 2007. **22**(9-10): p. 2165-2170.
54. Krajewska, A., Radecki J. e Radecka, H.; *A Voltammetric Biosensor Based on Glassy Carbon Electrodes Modified with Single-Walled Carbon Nanotubes/Hemoglobin for Detection of Acrylamide in Water Extracts from Potato Crisps. Sensors*, 2008. **8**(9): p. 5832-5844.
55. Garabagiu, S. e Mihailescu G.,; *Simple hemoglobin-gold nanoparticles modified electrode for the amperometric detection of acrylamide. J. Electroanal. Chem.*, 2011. **659**(2): p. 196-200.
56. Sagratini, G.; Fabbri A.; Marucci, G. Ricciutelli, M; Vittori, S.; e Ammendola, S.; *HPLC-MS validation of QualisaFoo® biosensor kit for cost-effective control of acrylamide levels in Italian coffee. Food Control*, 2007. **18**(10): p. 1267-1271.

57. Nelson Silva, Dulce G.; Karmali A. e Matos, M.; Biosensor for acrylamide based on an ion-selective electrode using whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* containing amidase activity. *Biocatal Biotransfor*, 2009. **27**(2): p. 143-151.
58. Bardeletti Gilbert; Séchaud, F. e Coulet, P.R.; *Amperometric Enzyme Electrodes for Substrate and Enzyme Activity Determinations*, in *Biosensor Principles and Applications*. 1991, Marcel Dekker, Inc: New York. p. 1-45.
59. Departamento de Ciência dos Materiais - Universidade Nova de Lisboa. *Guia da Divulgação - Engenharia dos Materiais*. Acedido em 20/12/2010; Consultado em: <http://www.dcm.fct.unl.pt/dcm/brochura/brochura.pdf>.
60. Gomes, M., *Desenvolvimento de sensores baseados em microbalanças de cristais piezoelétricos para a determinação de CO₂ e SO₂*, in *Departamento de Química*. 1996, Universidade de Aveiro: Aveiro.
61. O'Sullivan, C.K. e Guilbault, G.G.; *Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications*. *Biosens. Bioelectron.*, 1999. **14**(8-9): p. 663-670.
62. Luong, H.T.J. e Guilbault, G.G.; *Analytical Applications of Piezoelectric Crystal Biosensors*, in *Biosensor Principles and Applications*. 1991, Marcel Dekker, Inc: New York. p. 107-138.
63. G., S., *Verwendung von Schwingquartzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. *Z. Physik*, 1959. **155**: p. 206-22.
64. Cavic, A.; Thompson B., M. e Hayward, G. L; *Acoustic waves and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor-liquid interface*. *Analyst*, 1999. **124**(10): p. 1405-1420.
65. Ferreira, G.N.M., Silva, A.-C e Tomé, B.; *Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance*. *Trends biotechnol.*, 2009. **27**(12): p. 689-697.
66. Shons, A., Dorman, F. e Najarian J.; , *An immunospecific microbalance*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1972, **6**(565).
67. Ermolaeva, T., Kalmykova, E. e Shashkanova, O.; *Piezoquartz biosensors for the analysis of environmental objects, foodstuff and for clinical diagnostic*. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2008. **78**(12): p. 2430-2444.
68. Mello, L.D e Kubota, L.T.; *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. *Food Chem.*, 2002. **77**(2): p. 237-256.
69. IUPAC, *Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992)*. *Pure & Appl. Chem.*, 1992. **64**(1): p. 143-168.
70. Turner, A.P.F. *Biosensors: Past, present and future*. 1997, acedido em 25/09/2011, Consultado em <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/chinap.htm>.

71. Pierre, R.C., *What is a biosensor?*, in *Biosensor Principles and Applications*. 1991, Marcel Dekker, Inc: New York. p. 1-6.
72. Spencer, F., Meusel, M. e Siegmann-Thoss C.;, *Biosensors based on flow-through systems*, in *Frontiers in Biosensorics II -Practical Applications*, S.F. W., S. F., and F. J., Editors. 1997, Birkhauser Verlag: Basel. p. 27-44.
73. Schmidt, H.-L; Becker, T.; Ogbomo, I. e Schuhmann, W.; *Flow-injection analysis systems with immobilized enzymes. Improvement of applicability by integration of coupled reactions, separation steps and background correction*. *Talanta*. 1996 43: p. 937-942.
74. Karmali, A., Pacheco, R.; Tata, R. E Brown, P.;. *Substitutions of Thr-103-Ile and Trp-138-Gly in amidase from Pseudomonas aeruginosa are responsible for altered kinetic properties and enzyme instability*. *Mol. Biotechnol.*, 2001. **17**(3): p. 201-212.
75. Fragoso, A.F.P., *Efeitos estruturais e cinéticos de micelas invertidas sobre uma amidase de Pseudomonas aeruginosa*, in *Departamento de Engenharia Química*. 2008, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa: Lisboa.
76. Cabral, J.M.S., M.R. Aires-Barros, and M. Gama, *Engenharia Enzimática*. 2003, Lisboa: Lidel.
77. Copeland, R.A., *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* 2000, New York: John Wiley & Sons.
78. Andrade, J; Karmali, A.Carrondo, M. A. e Frazao, C.; *Structure of amidase from Pseudomonas aeruginosa showing a trapped acyl transfer reaction intermediate state*. *J. Biol. Chem.*, 2007. **282**(27): p. 19598-19605.
79. Christian, G.D., *Analytical Chemistry* 5th ed. 1994, New York: John Wiley & Sons, Inc.
80. *Bicatalysis - immobilization of enzymes and cells*, *acedido em 25/08/2011*]; Consultado em http://loschmidt.chemi.muni.cz/peg/lecture/biocat_lecture10.pdf.
81. Chang-Yu, L.,. Huang, I.Y. e En-Chang, W. ;. *The effect of glutaraldehyde cross-linking layer on QCM based alpha-fetoprotein biosensor*. in *Sensors*, 2009 IEEE. 2009.
82. Dutta, A.K., Nayak, A. e Belfort, G.; *Viscoelastic properties of adsorbed and cross-linked polypeptide and protein layers at a solid-liquid interface*. *J. Colloid. Interface Sci.*, 2008. **324**(1-2): p. 55-60.
83. Deng, C., Li, M.; Xie, Q.; Liu, M.; Tan, Y.; Xu, X. e Yao, S.; *New glucose biosensor based on a poly(o-phenylenediamine)/glucose oxidase-glutaraldehyde/Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modifications*. *Anal. Chim. Acta*, 2006. **557**(1-2): p. 85-94.
84. Migneault, I.; Dartiguenave, C. ; Bertrand, M. J. e Waldron, K. C.;, *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. *Bio. Techniques*, 2004. **37**(5): p. 790-802.

85. Alfaya, A.A.S. e Kubota L.T.; A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, 2002. **25**: p. 835-841.
86. Nassar, E.J., Messaddeq, Y. e. Ribeiro, S.J.L.; Influência da catálise ácida e básica na preparação da sílica funcionalizada pelo método sol-gel. *Química Nova*, 2002. **25**: p. 27-31.
87. Kamisetty, N.; Pack, S.; Nonogawa, M.; Devarayapalli, K.; Kodaki, T. e Makino, K., Development of an efficient amine-functionalized glass platform by additional silanization treatment with alkylsilane. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006. **386**(6): p. 1649-1655.
88. Stults, C.L.M., Wade, A.P e Crouch, S.R.; Computer-assisted optimization of an immobilized-enzyme flow-injection system for the determination of glucose; *Anal. Chim. Acta*; 1987. **192**, p. 155-163.
89. Sequeira, S.; Evtuguin, D.; Portugal, I.e Esculcas, A.P.; Synthesis and characterisation of cellulose/silica hybrids obtained by heteropoly acid catalysed sol-gel process. *Mater. Sci. Eng., C*, 2007. **27**(1): p. 172-179.
90. On-line measurement of ammonium ion. Acedido em 22/07/2011]; Consultado em <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/Contin/ammonia.htm>.
91. Kiranas, E.R., Karayannis, M.I. e Tzouwara-Karayanni S.M.; Enzymatic methods for the determination of [small alpha]-glycerophosphate and [small alpha]-glycerophosphate oxidase with an automated FIA system. *Talanta*, 1998. **45**(5): p. 1015-1021.
92. Franchini, R.A.B. Matos, M. A. C.; Colombara, R. e Matos, R. C.;, Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatic reactor. *Talanta*, 2008. **75**(1): p. 301-306.
93. Karmali, A., Tata, R. e Brown P.;, Substitution of Glu-59 by val in amidase from *Pseudomonas aeruginosa*; results in a catalytically inactive enzyme. *Mol. Biotech.*, 2000. **16**(1): p. 5-16.